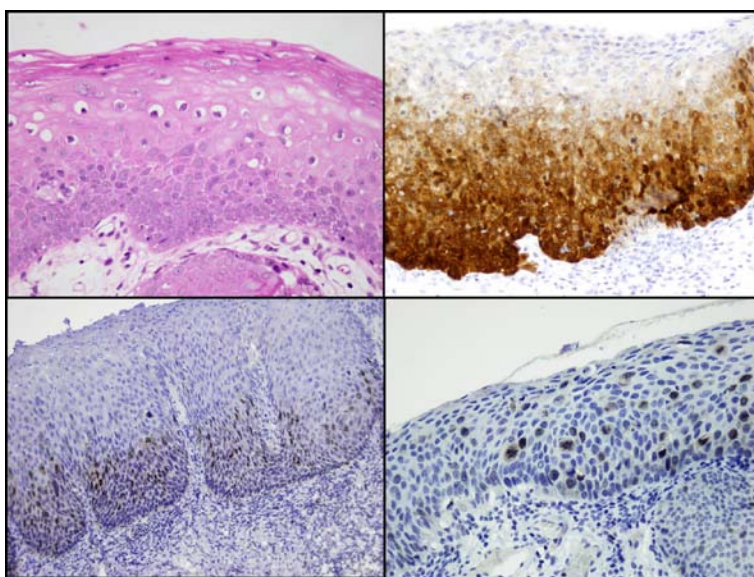




Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

FACTORES MOLECULARES EN LA PROGRESIÓN DE LAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES CERVICALES



TESIS DOCTORAL

JOSÉ LUIS CIRELLA ELISIS

2010



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

**FACTORES MOLECULARES EN LA
PROGRESIÓN DE LAS NEOPLASIAS
INTRAEPITELIALES CERVICALES**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ LUIS CIRELLA ELISIS

2010



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

Don DAVID ALONSO HARDISSON HERNÁEZ, Profesor Titular de Anatomía Patológica y Director del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA

Que Don JOSÉ LUIS CIRELLA ELISIS, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado “**FACTORES MOLECULARES EN LA PROGRESIÓN DE LAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES CERVICALES**” que cumple, a mi juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Para que así conste donde proceda, firmo el presente escrito en Madrid, a 6 de septiembre de 2010.

Fdo.: David A. Hardisson Hernández

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. David Hardisson**, por haber aceptado ser tutor. Sus conocimientos, enseñanzas metodológicas y la inversión de su valioso tiempo permitieron culminar esta Tesis. Lo más importante aún, su valiosa amistad.

Al **Dr. Javier Regadera**, por sus ideas “transatlánticas” y liberar el conocimiento de las fronteras, por ser consejero y amigo.

Al **Dr. Manuel Nistal**, por su incondicional apoyo académico y científico.

Al personal de la **Comisión de Posgrado** y del **Departamento de Anatomía Patológica** de la UAM, por brindarme toda su colaboración cuando la necesité.

A las **Autoridades Académicas de la Universidad Autónoma de Madrid**, por hacer posible realizar un doctorado a distancia.

A **Doña Begoña, Olga y David**, quienes hicieron posible una “estancia familiar” en Madrid.

A las Dras. **Victoria García de Barriola** y **Mirían Naranjo de Gómez** de la Sección de Patología Ginecológica “Dr. José A. Suárez” del Instituto Anatomopatológico (IAP) de la UCV por su asesoría y apoyo constante.

A la sección de Inmunohistoquímica (IAP-UCV) y especialmente a la Histotecnóloga **Joyce Santiago** por la colaboración prestada para la realización de las inmunorreacciones.

A mis compañeros y compañeras de la **Sección de Anatomía Microscópica del Departamento de Ciencias Morfológicas de la UCLA**, por permitirme alcanzar las metas planificadas.

A mi Alma Mater: **La Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”**.

A **mi familia** y en particular a **mis padres**, por su comprensión, sabios consejos y apoyo en todo momento.

A **Dios**, por permitirme estar aquí.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

A mi esposa por su amor, apoyo

incondicional y estímulo constante.

A mis hijos Dilcia María y Miguel Santiago

razón de vida y el continuum de mi ser.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.-Cáncer de cuello uterino. Generalidades.....	2
1.2.-Lesiones precursoras del carcinoma de cérvix uterino.....	2
1.3.-Factores etiológicos.....	6
1.4.-Biología del VPH.....	8
1.5.-Función de los cofactores en la carcinogénesis cervical	11
1.6.-Métodos diagnósticos de las neoplasias intraepiteliales	11
1.7.-Infección por VPH y papel de las proteínas E6/E7: interacción con proteínas celulares	12
1.8.-Ciclo celular y función de la proteína p16	14
1.9.-Proteína p53	18
1.10.-Mitosis: anclaje de los cromosomas al huso y segregación.....	21
1.11.-Aurora quinasas	22
1.11.1.-Estructura y localización de las Aurora quinasas.....	22
1.11.2.-Funciones de las Aurora quinasas.....	25
1.11.3.-Aurora quinasas y su relación con tumores	26
1.12.-Survivina	28
1.13.-Proteína Ki67	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
2.1.-Hipótesis.....	33
2.2.-Objetivos	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
3.1.-Material	35
3.2.-Métodos.....	35
3.2.1.-Procesamiento de las muestras y tinciones histológicas.....	35
3.2.2.-Método inmunohistoquímico de la expresión proteica.....	35
3.2.3.-Interpretación de los resultados de la inmunotinción.....	37
3.2.4.-Análisis estadístico.....	38

4. RESULTADOS	40
4.1.-Características de la muestra	41
4.2.-Expresión inmunohistoquímica de p16	44
4.3.-Expresión inmunohistoquímica de Ki67	46
4.4.-Expresión inmunohistoquímica de p53	47
4.5.-Relación entre la expresión de las proteínas p16 y Ki67	49
4.6.-Relación entre la expresión de las proteínas p16 y p53	49
4.7.-Relación entre la expresión de las proteínas p53 y Ki67	50
4.8.-Expresión de survivina	51
4.9.-Expresión de Aurora A	53
4.10.-Expresión de Aurora B	56
4.11.-Correlación entre la expresión de survivina, Aurora B y Aurora A	58
4.12.-Relación entre la expresión de p16 y survivina	60
4.13.-Relación entre la expresión de p16, Aurora A y Aurora B	61
4.14.-Relación entre la expresión de Ki67 y survivina	63
4.15.-Relación entre la expresión de Ki67, Aurora A y Aurora B	64
4.16.-Relación entre la expresión de p53 y survivina	65
4.17.-Relación entre la expresión de p53 y Aurora quinasas A y B	66
4.18.-Comparación de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores utilizados y tipo de lesión	67
4.18.1.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos analizados en la NIC I	67
4.18.2.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos utilizados en la NIC II	68
4.18.3.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos utilizados en NIC III- Carcinoma <i>in situ</i>	68
4.18.4.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos utilizados en los carcinomas microinfiltrantes	69
5. DISCUSIÓN	70
5.1.-Expresión de p16	72
5.2.-Expresión de p53	75
5.3.-Expresión de Ki67	76
5.4.-Expresión de Ki67 y p16	77

5.5.-Expresión de Ki67 y p53	79
5.6.-Expresión de p16 y p53	79
5.7.-Expresión de survivina	80
5.8.-Expresión de survivina y p16.....	82
5.9.-Expresión de survivina y p53.....	82
5.10.-Expresión de survivina y Ki67	83
5.11.-Expresión de Aurora A y Aurora B	83
5.12.-Expresión de Aurora quinasas y Ki67	86
5.13.-Expresión de Aurora quinasas y p53	87
5.14.-Expresión de Aurora quinasas y p16	88
5.15.-Expresión de Aurora quinasas y survivina.....	88
 6. CONCLUSIONES.....	 90
 7. BIBLIOGRAFÍA.....	 93
 8. RESUMEN.....	 105

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Ejemplos representativos de neoplasias intraepiteliales del cérvix uterino.....	4
Figura 2. Terminología de las lesiones preneoplásicas del cérvix uterino.	5
Figura 3. Organización del genoma de los papilomavirus	8
Figura 4. Estrategia de infección y propagación de los VPH.....	10
Figura 5. Genoma del VPH y sitio de disrupción. Mecanismo de activación de E6-E7	11
Figura 6. Implicaciones de la infección por VPH. Papel de la proteína E7	14
Figura 7. Funciones de la proteína E6 del VPH.....	14
Figura 8. Papel de la proteína Rb en la regulación del punto de control G1-S del ciclo celular.....	16
Figura 9. Representación esquemática del papel de las ciclinas en el control del ciclo celular.....	17
Figura 10. Mecanismo de acción de E7 de VPH sobre pRb y sobreexpresión de p16.....	18
Figura 11. Representación esquemática de la estructura del gen <i>TP53</i>	19
Figura 12. Esquema de las funciones de p53	20
Figura 13. Representación esquemática de la estructura de las Aurora quinasas	23
Figura 14. Fases del ciclo celular y sitios de acción de Aurora A y Aurora B	24
Figura 15. Localización de Aurora quinasas durante las fases del ciclo celular.....	25
Figura 16. Representación de las principales funciones de Aurora A y Aurora B	25
Figura 17. Función de la survivina como inhibidor de la apoptosis.	29
Figura 18. Función de la survivina en la mitosis.	29
Figura 19. Distribución de las lesiones en la muestra estudiada.....	41
Figura 20. Lesiones tipo NIC I, II, III, carcinoma microinvasor (HE).....	42
Figura 21. Distribución de la muestra según edad y tipo de lesión epitelial.	43
Figura 22. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y el tipo de patología.....	44
Figura 23. Expresión de p16 en NIC I.....	45
Figura 24. Expresión de p16 en NIC II.....	45
Figura 25. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de Ki67 y el tipo de patología.....	46
Figura 26. Expresión de Ki67 en NIC I.....	47
Figura 27. Expresión de Ki67 en NIC III-Carcinoma in situ.	47

Figura 28. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y el tipo de patología.....	48
Figura 29. Inmunotinción con p53 en NIC III-Carcinoma in situ	48
Figura 30. Extensión de la inmuoexpresión de p53, p16 y Ki67 en relación al espesor del epitelio.	51
Figura 31. Representación esquemática del porcentaje de expresión de survivina	51
Figura 32. Representación de la distribución de la serie según la expresión de survivina en relación al espesor epitelial.....	52
Figura 33. Expresión de survivina en NIC I.....	52
Figura 34. Expresión de survivina en NIC II.	53
Figura 35. Expresión nuclear de survivina en NIC III.....	53
Figura 36. Representación esquemática del porcentaje de expresión de Aurora A.....	54
Figura 37. Representación de la distribución de la serie según la expresión de Aurora A en relación al espesor del epitelio.	55
Figura 38. Expresión de Aurora A en NIC III-Carcinoma in situ.....	55
Figura 39. Expresión de Aurora A en NIC III-Carcinoma in situ.....	56
Figura 40. Representación esquemática del porcentaje de expresión de Aurora B.	56
Figura 41. Representación de la distribución de la serie según la expresión de Aurora B en relación al espesor del epitelio.....	57
Figura 42. Expresión nuclear de Aurora B en una zona de NIC I.	57
Figura 43. Expresión nuclear de Aurora B en una zona de NIC II.....	58
Figura 44. Expresión nuclear de Aurora B en una zona de NIC III.....	58
Figura 45. Media, desviación típica, mínimo y máximo valor de los casos según la expresión de survivina.	59
Figura 46. Media, desviación típica, mínimo y máximo valor de los casos según la expresión de Aurora B.	59
Figura 47. Media, desviación típica, mínimo y máximo valor de los casos según la expresión de Aurora A.....	60
Figura 48. Porcentaje medio de expresión de survivina, Aurora A y Aurora B en la serie estudiada.	60
Figura 49. Representación esquemática entre la expresión de p16 y survivina.....	61
Figura 50. Representación esquemática entre la expresión de p16 y Aurora B.....	62
Figura 51. Representación esquemática entre la expresión de p16 y Aurora A.....	63
Figura 52. Representación esquemática entre la expresión de Ki67 y survivina.....	64

Figura 53. Representación esquemática entre la expresión de Ki67 y Aurora B.....	64
Figura 54. Representación esquemática entre la expresión de Ki67 y Aurora A.	65
Figura 55. Representación esquemática entre la expresión de p53 y survivina.....	66
Figura 56. Representación esquemática entre la expresión de p53 y Aurora B.....	66
Figura 57. Representación esquemática entre la expresión de p53 y Aurora A.....	67
Figura 58. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en las NIC I.	67
Figura 59. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en las NIC II.	68
Figura 60. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en las NIC III.....	68
Figura 61. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en los carcinomas microinfiltrantes.	69

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Frecuencia aproximada de regresión espontánea, persistencia y progresión en la neoplasia intraepitelial del cérvix uterino	5
Tabla 2. Sustratos y localización subcelular de las Aurora quinasas.....	24
Tabla 3. Detalles de los anticuerpos utilizados (primera fase del estudio).....	36
Tabla 4. Detalles de los anticuerpos utilizados (segunda fase del estudio)	37
Tabla 5. Interpretación de los resultados de la expresión inmunohistoquímica de p16, p53 y Ki67	38
Tabla 6. Distribución de las pacientes según grupo de edad	41
Tabla 7. Distribución de la muestra según el tipo de patología.....	43
Tabla 8. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y el tipo de patología ...	44
Tabla 9. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de Ki67 y el tipo de patología .	46
Tabla 10. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y el tipo de patología .	48
Tabla 11. Relación entre la expresión del las proteínas p16 y Ki67	49
Tabla 12. Relación entre la expresión del las proteínas p16 y p53	49
Tabla 13. Relación entre la expresión del las proteínas p53 y Ki67	50
Tabla 14. Distribución de la muestra según la expresión de Aurora A en relación al espesor del epitelio	54
Tabla 15. Relación entre la expresión de p16 y survivina	61
Tabla 16. Relación entre la expresión de p16 y Aurora B	62
Tabla 17. Relación entre la expresión de p16 y Aurora A.....	62
Tabla 18. Relación entre la expresión de Ki67 y survivina	63
Tabla 19. Relación entre la expresión de p53 y survivina	65

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1.-Cáncer de cuello uterino. Generalidades.

El cáncer de cuello uterino continúa siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad, no sólo en Venezuela sino a nivel mundial. Cada año se presentan en el mundo alrededor de 466.000 nuevos casos. De las 231.000 muertes anuales a causa de este cáncer, aproximadamente el 80% se produce en los países en desarrollo donde los programas de detección precoz no están bien desarrollados o son pocos eficaces. Latinoamérica es una de las regiones con mayor incidencia a nivel mundial.¹

América Latina y el Caribe presentan una de las tasas de mortalidad más elevadas por cáncer cervicouterino en el mundo, junto con el África subsahariana y el Asia Sudoriental. La mayor carga de la enfermedad la sufren las mujeres del Caribe y Centroamérica, donde se observan unas tasas de mortalidad de 16 por 100.000 y 15 por 100.000 mujeres, respectivamente. Haití presenta la mayor tasa de mortalidad por cáncer cervicouterino en la región (48 por 100.000 mujeres).² En los Estados Unidos de América fueron diagnosticados alrededor de 12.900 nuevos casos y 4.400 mujeres murieron por esta causa en 2001.³ En 2004, el cáncer de cuello uterino representó la segunda causa de mortalidad en Venezuela con un total de 1.116 casos reportados, cifra que aumentó en 2006 hasta un total de 1.251 casos.⁴

La carcinogénesis es un proceso complejo que se entiende hoy en día como una secuencia de múltiples factores. Las neoplasias intraepiteliales cervicales son consideradas lesiones precursoras del carcinoma invasor de cuello uterino y la probabilidad de que progresen depende de diversas situaciones. A pesar de que la progresión puede durar varios años, es ampliamente reconocido que deben realizarse estudios periódicos junto con un adecuado seguimiento de las lesiones detectadas, para disminuir significativamente la frecuencia de morbilidad y mortalidad.

1.2.-Lesiones precursoras del carcinoma de cérvix uterino.

Se reconoce la existencia de lesiones precursoras del carcinoma del cuello uterino desde el año 1900, cuando Cullen advierte la semejanza morfológica entre estas

lesiones y el carcinoma invasor adyacente. En 1930, Broders introduce el término de carcinoma *in situ*. El reconocimiento para la época de la relación espacial y temporal existente entre el carcinoma *in situ* y el invasor, llevó a algunos autores a plantear la hipótesis de que el carcinoma invasor se desarrolla a partir de una lesión precursora bien definida histológicamente.⁵

En 1956, Reagan introduce el término de displasia para referirse al espectro de lesiones que presentaban características intermedias entre el epitelio cervical normal y el carcinoma *in situ* y la define como una proliferación anormal de células epiteliales escamosas con pérdida de la polaridad funcional. Dependiendo de la extensión de esos cambios la displasia fue clasificada en: displasia leve (tercio epitelial inferior), moderada (dos tercios del espesor epitelial) y severa (todo el espesor del epitelio).⁵

En 1967, Richart basándose en diversas observaciones introduce el concepto de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que ha terminado por imponerse en la actualidad. Este término incluye epitelios con alteraciones estructurales y madurativas, pero que están bien diferenciados, es decir, que se corresponden con el concepto clásico de displasia leve, hasta epitelios con ausencia total de diferenciación, situados en la superficie, o relleno de glándulas, pero sin invasión, es decir, se corresponden con el concepto clásico de carcinoma *in situ*.

La introducción del término “neoplasia intraepitelial” se basa fundamentalmente en el concepto de que entre las displasias y el carcinoma *in situ* existe suficiente semejanza para concluir que ambas constituyen dos estadios evolutivos de una misma entidad. Así, se ha demostrado que un número significativo de displasias, si no se tratan adecuadamente y se dejan a su evolución espontánea, se transforman en carcinoma *in situ*.⁵

Las principales alteraciones morfológicas que caracterizan a las neoplasias intraepiteliales son:

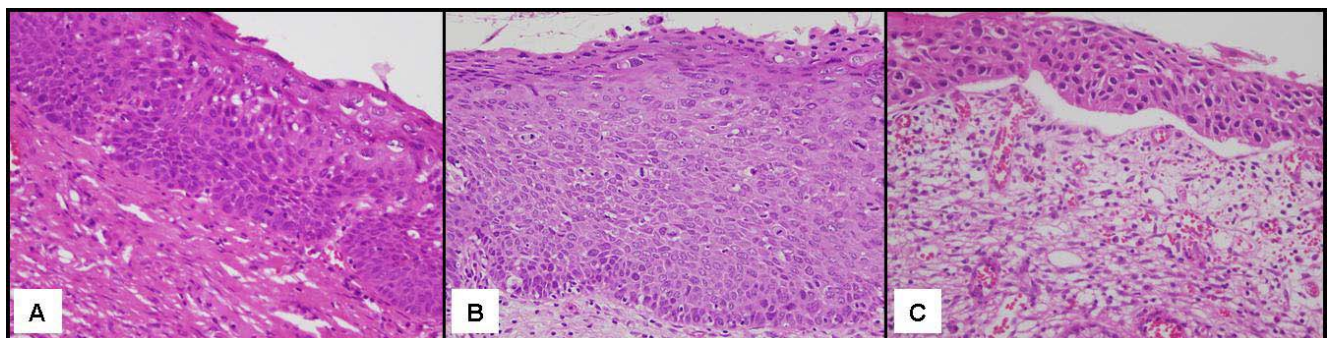
- Pérdida de la estratificación y polaridad celular.
- Ausencia de diferenciación y de maduración.

- Alteración en el tamaño y forma de las células epiteliales con aumento de la relación núcleo-citoplasma.
- Alteraciones en el núcleo (hipercromatismo y distribución irregular de la cromatina nuclear).
- Aumento del número de mitosis e incluso mitosis anormales.
- Las alteraciones afectan sólo el epitelio de superficie, aunque pueden extenderse al que reviste las glándulas endocervicales.

Según la intensidad de estas alteraciones, se distinguen tres grados (Figura 1):

1. NIC grado I (displasia leve). Las alteraciones madurativas afectan aproximadamente al tercio inferior del espesor total del epitelio.
2. NIC grado II (displasia moderada). Las alteraciones afectan entre un tercio y dos tercios de todo el espesor del epitelio.
3. NIC grado III (displasia severa-carcinoma *in situ*). Las alteraciones se extienden prácticamente a todo el espesor del epitelio.

Figura 1. Ejemplos representativos de neoplasias intraepiteliales del cérvix uterino: A) NIC I, B) NIC II, C) NIC III.

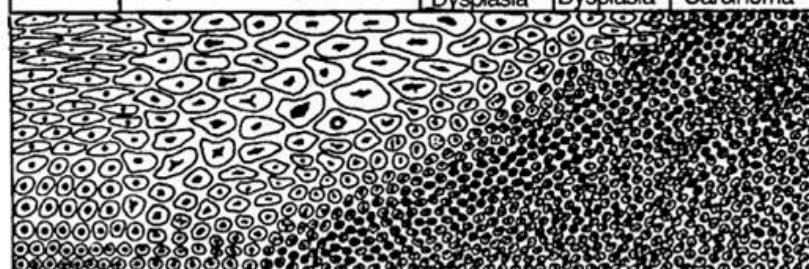


En 1985, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos propone una nueva clasificación orientada a la citología (llamada clasificación Bethesda) en la que se descarta el sistema de graduación de Papanicolaou así como la referencia al término NIC y se introduce el concepto de lesión intraepitelial escamosa (*Squamous*

Intraepithelial Lesion, SIL) de bajo grado y de alto grado. La lesión intraepitelial escamosa de bajo grado comprende epitelios que muestran cambios en su estructura y en las células, análogos a la displasia leve y al NIC I. Por lo general, se trata de lesiones autolimitadas que rara vez progresan a carcinoma invasor. La lesión intraepitelial escamosa de alto grado comprende epitelios con cambios idénticos a los descritos en la displasia moderada o grave, o a las características de NIC II o NIC III. Estas lesiones tienen un alto potencial de progresión hacia carcinomas invasores, por lo que constituyen auténticas lesiones premalignas (Figura 2).

Figura 2. Terminología de las lesiones preneoplásicas del cérvix uterino.

Squamous Intraepithelial Lesion (SIL)				
Low Grade		High Grade		
Condyloma		Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)		
		Grade 1	Grade 2	Grade 3
Normal	Very Mild-Mild Dysplasia	Moderate Dysplasia	Severe Dysplasia	In situ Carcinoma



The image shows a series of five microscopic views of cervical tissue, corresponding to the stages in the table above. From left to right: 1. Normal squamous epithelium with a clear maturation pattern. 2. Very Mild-Mild Dysplasia, showing slight nuclear enlargement and hyperchromasia. 3. Moderate Dysplasia, showing more pronounced nuclear atypia and loss of maturation. 4. Severe Dysplasia, showing significant nuclear atypia and architectural disorganization. 5. In situ Carcinoma, showing a full-thickness replacement of the normal epithelium by atypical cells.

La posibilidad de regresión, persistencia o progresión de estas lesiones se relaciona con el grado de las mismas (Tabla 1).⁶

Tabla 1. Frecuencia aproximada de regresión espontánea, persistencia y progresión en la neoplasia intraepitelial del cérvix uterino.

	CIN I	CIN II	CIN III
Regresión	60%	40%	30%
Persistencia	30%	35%	48%
Progresión a CIN III	10%	20%	-
Progresión a cáncer invasor	<1%	5%	22%

Esta terminología y clasificación le resulta muy útil al clínico para reconocer que está ante una lesión que excepcionalmente se transformará en invasora y que, por tanto,

permite adoptar una actitud expectante de control, o que por el contrario se encuentra ante una lesión con potencialidad de transformación en un carcinoma invasor y que deberá tratarse de forma más agresiva.

Sin embargo, esta clasificación ha sido también objeto de críticas. En primer lugar, resulta difícil diferenciar ambos grupos con seguridad mediante la citología y la histología. Además, el término lesión parece apropiado para el primer grupo pero no para el segundo, que es una verdadera lesión premaligna o neoplasia.⁵

1.3.-Factores etiológicos.

Estudios epidemiológicos han permitido identificar un grupo de factores de riesgo que podrían estar involucrados en la histogénesis de las lesiones precursoras y carcinoma de cuello, entre las cuales están:

- Virus del papiloma humano (VPH), que se considera un factor necesario aunque no suficiente para el desarrollo de estas lesiones.
- El inicio temprano de las relaciones sexuales y la multiplicidad de parejas.
- Alta paridad.
- Hábito tabáquico.
- Uso de anticonceptivos hormonales.
- Factores nutricionales.

La historia natural y estudios de seguimiento demuestran claramente que la infección por VPH precede al desarrollo del cáncer cervical por muchos años y confirman que la transmisión sexual es el modo por el cual se adquiere la infección. Está suficientemente demostrado que el ADN del VPH puede ser identificado en muestras adecuadas de cáncer cervical prácticamente en el 100 % de los casos. Además, las implicaciones de reconocer que en ausencia de ADN viral el cáncer no se desarrolla tienen una importancia práctica considerable.⁷

En numerosos estudios epidemiológicos se ha identificado la relación entre el cáncer de cuello uterino y la infección por el virus del papiloma humano. La infección por el VPH es hoy día la enfermedad de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial, con un número estimado de 5,5 millones de nuevas infecciones por año en los Estados Unidos. Se ha establecido que la probabilidad de presentar infección por VPH durante el tiempo de vida en personas sexualmente activas es de alrededor del 80 %.¹

La infección por el VPH evoluciona de forma natural hacia la curación espontánea, que ocurre en la mayoría de los casos. En la segunda década de la vida se estima una prevalencia del 20-25%, pero en algunos grupos de adolescentes o de mujeres jóvenes la infección llega a afectar hasta un 70% de los individuos. En la tercera década la prevalencia disminuye considerablemente, y a partir de los 35 años se mantiene estable en unos valores próximos al 5%.⁸

Se han identificado más de 100 tipos de VPH, de los cuales más de 40 afectan al área anogenital. De ellos, unos 15 son oncogénicos aunque estas cifras aumentan día a día con la identificación de nuevos serotipos. La mayoría de las infecciones por el VPH son subclínicas, detectables por cambios en la citología o la colposcopia, o bien latentes, detectables únicamente por análisis de ADN viral. Sólo un 1% de los adultos sexualmente activos presenta lesiones clínicas en forma de condilomas. El VPH se clasifica en relación con su asociación con el cáncer cervical y lesiones precursoras y se divide en tipos de **bajo riesgo** (6, 11, 42, 43 y 44, entre otros) y tipos de **alto riesgo** (principalmente 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70, 73 y 82). Los serotipos más comunes de VPH son los 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, y 35; en conjunto, son responsables de aproximadamente el 90% de todos los casos de cáncer de cérvix uterino.

Las infecciones por los tipos denominados “de bajo riesgo” siguen predominantemente un curso silente y se engloban mayoritariamente en el grupo de las neoplasias cervicales de grado I (NIC I) o lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (L-SIL). En una proporción menor son “de alto riesgo” y evolucionan a NIC II, NIC III o a carcinoma.⁹

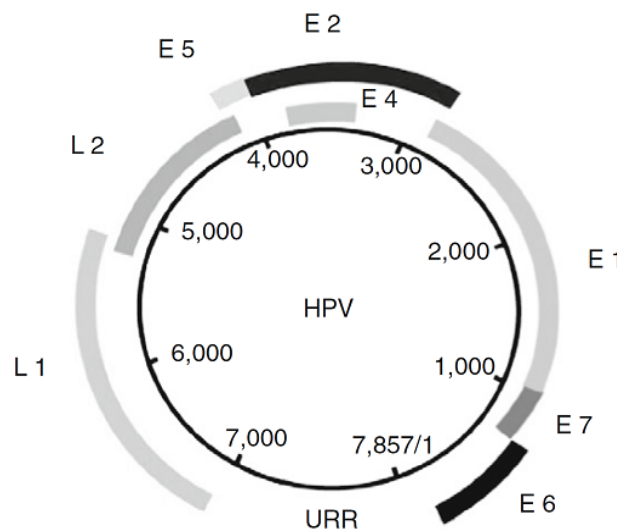
Actualmente, se acepta que la asociación entre el cáncer de cuello uterino y la infección por VPH es de causalidad. Las evidencias epidemiológicas indican que en

más del 75% de los carcinomas *in situ* y prácticamente en el 100% de los carcinomas infiltrantes cervicales se hallan ciertos tipos de VPH considerados de riesgo; de ellos, el 75% corresponde a los serotipos 16 (el más frecuente) o 18 (el más oncogénico).¹⁰

1.4.-Biología del VPH.

El virus del papiloma humano es miembro de la familia Papovaviridae. Se caracterizan por ser virus pequeños con un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular, de doble cadena, de aproximadamente 8.000 pares de bases de longitud, y una cápside proteica icosaédrica.¹¹ Su genoma contiene de 9 a 10 regiones codificantes que se denominan marcos de lectura abierta (conocidas como ORFs, *Open Reading Frames*). Dichas regiones codificantes son segmentos de ADN que contienen secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas no estructurales involucradas en la regulación de las funciones virales y las proteínas estructurales implicadas en la producción de partículas infecciosas.¹² (Figura 3)

Figura 3. Organización del genoma de los papilomavirus (Lie & Kristensen, 2008).¹²



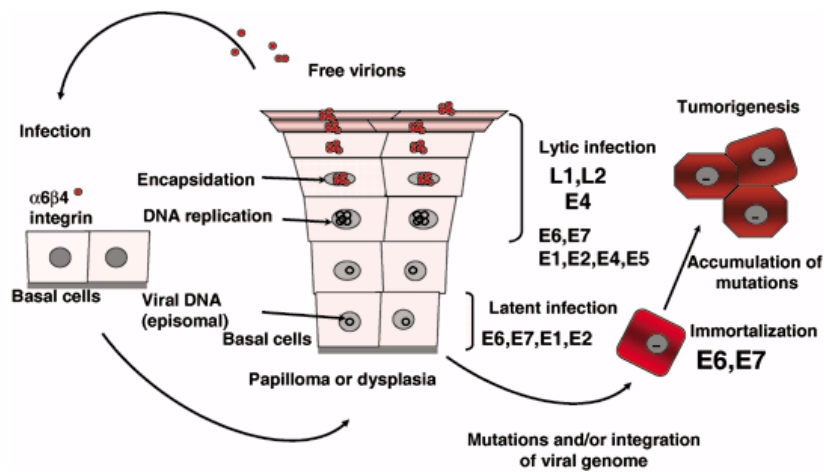
A efectos funcionales y didácticos, el genoma viral puede dividirse en tres regiones:

- a) Región de **genes tempranos** (E, del inglés *Early*) que codifican proteínas involucradas en la replicación de ADN viral, regulación transcripcional y transformación celular.
- b) Región de **genes tardíos** (L, del inglés *Late*), que codifican proteínas de la cápside viral.
- c) **Región de control** (LCR, *Long Control Region*) o también denominada URR (*Upper Regulatory Region*), que no contiene genes, pero sí importantes elementos de regulación transcripcional y replicacional y donde se localizan los promotores que inician la replicación.

E1 y E2 tienen acciones moduladoras importantes sobre la replicación del ADN viral ya que codifican proteínas que actúan sobre los promotores en la zona LCR. E4 codifica proteínas que interactúan con proteínas del citoesqueleto celular. La principal proteína capsular viene codificada por L1. La segunda proteína capsular, L2, más pequeña, parece importante para el ensamblaje del virión. E6 y E7, y posiblemente también E5, están relacionados con la capacidad transformante.¹³

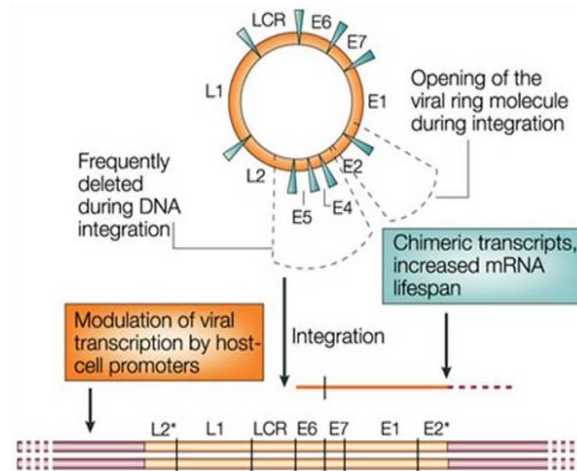
El primer paso para la infección por el VPH es el contacto de viriones con las células inmaduras del epitelio escamoso (células basales o células metaplásicas); después de la introducción del virus ocurren dos clases de infecciones: latentes o productivas. En la infección latente, el ADN viral permanece en el núcleo en su forma circular libre o episomal, el virus se mantiene en la superficie sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos identificables, por lo cual su detección sólo es posible mediante métodos moleculares. Por el contrario, en la infección activa o productiva existe una intensa actividad de replicación del ADN viral, con generación de viriones en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso.¹⁴ En esta etapa se producen cambios característicos que son detectados por citología e histología, entre los que se incluyen la acantosis, la vacuolización citoplasmática, la atipia nuclear y la binucleación.¹¹ (Figura 4)

Figura 4. Estrategia de infección y propagación de los VPH. Inicialmente, se produce la infección de las células basales con lo que se establece una fase de infección latente en la cual el ADN viral se replica sin producir viriones. En las capas superiores, al estar las células diferenciadas, la replicación del ADN viral se coordina con la expresión de proteínas de la cápside para producir viriones que luego son liberados a nuevos huéspedes. Los niveles de expresión de E6 y E7 en las células basales se consideran bastante bajos; sin embargo, la persistencia de la lesión puede determinar posibles mutaciones y/o integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped con lo que estas células se immortalizan y se hacen neoplásicas (Narisawa-Saito & Kiyono, 2007).¹⁴



El lugar por donde se rompe la estructura circular del genoma vírico para que éste pueda insertarse en el cromosoma huésped es constante. Se ha observado que la disrupción tiene lugar a nivel de E1-E2, lo que alterará su expresión y función.¹⁵ Como se ha comentado previamente, E1 y E2 son genes que codifican proteínas (pE1 y pE2) implicadas en la regulación de la transcripción viral y la replicación del ADN. En los VPH 16 y 18 E2 codifica una proteína que actúa a nivel del promotor localizado en LCR, regulando en sentido represor la actividad transcritora de E6 y E7, que a su vez codifican proteínas (pE6, pE7) relacionadas con la proliferación continuada de las células en el cáncer de cuello uterino y lesiones displásicas. La expresión continuada de E6/E7 (principalmente en VPH 16 y 18) es necesaria para la inmortalización y proliferación celular. La disrupción a nivel de E1/E2 significa que dejará de producirse la regulación negativa sobre E6/E7, lo que conduce a la sobreexpresión continua de E6/E7, favoreciendo primero la proliferación y después, la transformación neoplásica.¹⁶ (Figura 5)

Figura 5. Genoma del VPH y sitio de disrupción. Mecanismo de activación de E6-E7 (Zur Hausen, 2002).¹⁶



1.5.-Función de los cofactores en la carcinogénesis cervical.

Aunque muchas mujeres contraen infecciones cervicales por el VPH, la mayoría de éstas no progresan a cáncer. Por tanto, es probable que otros cofactores intervengan en el proceso patológico. Los tres grupos principales son: 1) cofactores medioambientales o exógenos, incluyendo anticonceptivos hormonales, hábito tabáquico y coinfección con otras enfermedades de transmisión sexual, 2) cofactores virales, como infección por tipos específicos, carga viral e integración viral y, 3) cofactores del huésped, incluyendo hormonas endógenas, hábitos sexuales, paridad, factores genéticos y otros factores relacionados con la respuesta inmunitaria.

1.6.-Métodos diagnósticos de las neoplasias intraepiteliales.

Estas lesiones se pueden manifestar clínicamente con sangrado vaginal irregular, leucorrea, sangrado o dolor durante el coito y disuria. El examen físico con la adecuada observación, incluyendo la colposcopia muestra diversos patrones útiles para la identificación de estas lesiones.

El estudio citológico ha demostrado ser desde que se implementó sensible y efectivo para detección de las lesiones preneoplásicas del cérvix uterino. Desde que Papanicolaou publicó en 1924 la técnica de tinción que permitía describir las células cancerosas a partir del aspirado cervical, el éxito ha sido indiscutible. Además la

utilización en grandes poblaciones es un factor importante considerando la relación de costo-efectividad. El estudio morfológico a través de la biopsia cervical con tinción de hematoxilina-eosina se considera el patrón de referencia para establecer el diagnóstico.

A pesar de todo lo planteado y considerando las cifras iniciales relacionadas con el problema de salud pública que representa el carcinoma de cuello uterino, surge la necesidad de buscar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas dado que la progresión y la regresión de lesiones cervicales premalignas no se pueden predecir usando parámetros citológicos o histomorfológicos convencionales. Por tanto, el desarrollo de métodos inmunohistoquímicos que permitan determinar cambios en la función de los productos de los genes implicados en la carcinogénesis del cérvix uterino tiene gran importancia en la detección precoz, diagnóstico y pronóstico de la neoplasia cervical. Además, con estos métodos se intenta disminuir la variabilidad intra e interobservador, los falsos positivos y negativos con lesiones reactivas y, en definitiva, se busca realizar una gradación correcta de la neoplasia.

La infección viral promueve la expresión anormal de ciclinas y factores inhibidores, se involucra en el ciclo celular y altera los mecanismos de apoptosis. Por ello, resulta necesario revisar la función de estas moléculas en los mecanismos de regulación del ciclo celular.

1.7.-Infección por VPH y papel de las proteínas E6/E7: interacción con proteínas celulares.

Las proteínas transformadoras E6 y E7 (pE6, pE7) interactúan sobre distintas proteínas celulares reguladoras de las que p53 y pRb (producto del gen supresor del retinoblastoma) son las más conocidas y estudiadas.^{17,18} E6 y E7 son inicialmente transcritas a través de un “promotor mayor” (p97 y p105 en VPH 16 y 18, respectivamente) alojado en LCR. Las proteínas E1/E2 actúan a este nivel impidiendo su activación. E6/E7 permanecen con frecuencia sin sobreexpresarse en VPH de bajo riesgo, en los que a menudo el cromosoma se encuentra en forma circular, no insertado en el genoma huésped.

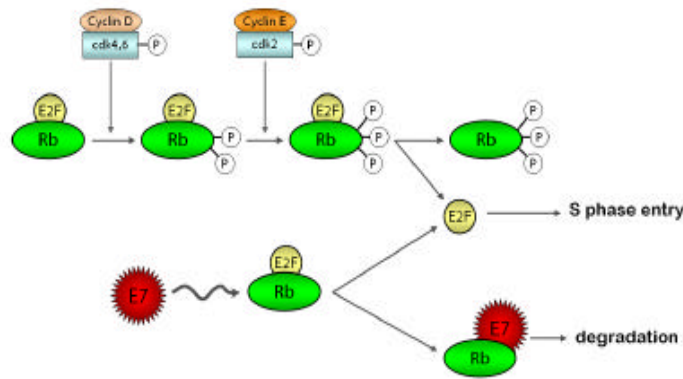
La pRb es una proteína celular involucrada en la regulación del ciclo celular. La forma activa hipofosforilada actúa inhibiendo la duplicación celular al impedir la

replicación del ADN en la transición de la fase G1 a la fase S. La oncoproteína E7 del VPH 16 se une con la forma activa de pRb con lo que ésta pierde su función reguladora del ciclo y permite que la célula pueda entrar en la fase S. Paralelamente, la pRb se une con factores activadores de la transcripción celular, impidiendo que estos actúen. Cuando E7 se une con pRb, algunos de estos factores activadores quedan libres, iniciándose procesos de transcripción celular.¹⁹

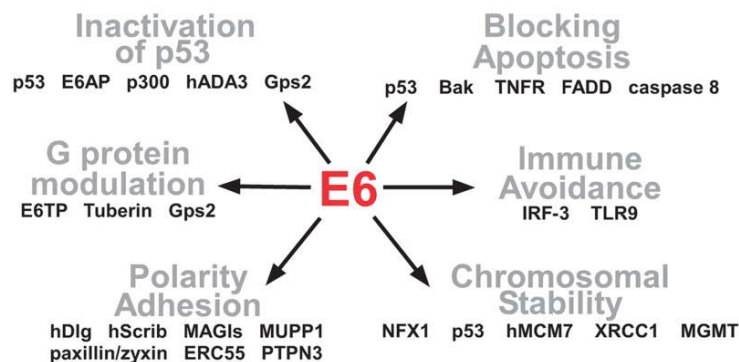
La proteína p53 también tiene una doble función reguladora, represora sobre la duplicación celular e inductora de apoptosis en casos de lesiones graves. En condiciones normales, p53 se encuentra en bajas concentraciones intracitoplasmáticas. Sin embargo, ante la presencia de algún factor tóxico que pueda dañar el ADN celular (agentes químicos mutagénicos, radiaciones, etc.) p53 aumenta su expresión y ejerce una función represora impidiendo la progresión del ciclo celular hacia la fase S. Por tanto, p53 ejerce un mecanismo de defensa celular para permitir la reparación del ADN y evitar así que se transmitan posibles alteraciones cromosómicas a las células hijas. La proteína E6 de los VPH de alto riesgo inhibe la función reguladora de p53.^{17,20,21}

A diferencia de otras oncoproteínas virales, no hay una unión molecular directa entre p53 y E6; la estructura terciaria de E6 desempeña una función importante en esta unión, así como una pequeña proteína denominada E6AP. El complejo pE6-p53 facilita la degradación citoplasmática de p53, impidiendo que ésta ejecute su función en el núcleo celular. Esto podría explicar el hecho de que las concentraciones de p53 no se encuentren elevadas (o incluso sean más bien bajas) en las displasias y el cáncer cervical asociados a VPH de alto riesgo. Este mecanismo es distinto a la mutación y sobreexpresión de p53 anómala que ocurre en otros tumores. La proteína E6 codificada por tipos VPH de bajo riesgo no tiene la misma capacidad funcional sobre p53.

Las oncoproteínas codificadas por E6/E7 de los VPH de alto riesgo tienen que ver con las propiedades de transformación y proliferación continua de las células infectada.²² La unión de E7 de VPH a la forma hipofosforilada de pRb interfiere con su unión del factor de transcripción E2F, resultando en su liberación y permitiendo así la entrada a la fase S del ciclo.²² (Figura 6)

Figura 6. Implicaciones de la infección por VPH. Papel de la proteína E7 (Jo & Kim, 2005).²²

En la Figura 7 se ilustran los diversos mecanismos de acción de la proteína E6 del VPH.²³

Figura 7. Funciones de la proteína E6 del VPH. Se observa que al interactuar con otras proteínas produce diversas modificaciones (Howie y cols, 2009).²³

1.8.-Ciclo celular y función de la proteína p16.

La serie de sucesos por los que una célula da lugar a dos células hijas constituye el ciclo celular, proceso altamente regulado que comprende el periodo entre dos divisiones mitóticas. Consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división celular y permanecer en un estado de reposo, periodo de quiescencia o fase G0. La fase G1 es el periodo de tiempo que sigue a una división celular, previa a la síntesis o replicación del ADN, que se produce en la fase S. Durante la fase G1, la célula duplica su tamaño y su masa debido a la síntesis continua de todos sus componentes como resultado de la transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo. En esta fase existe un punto de

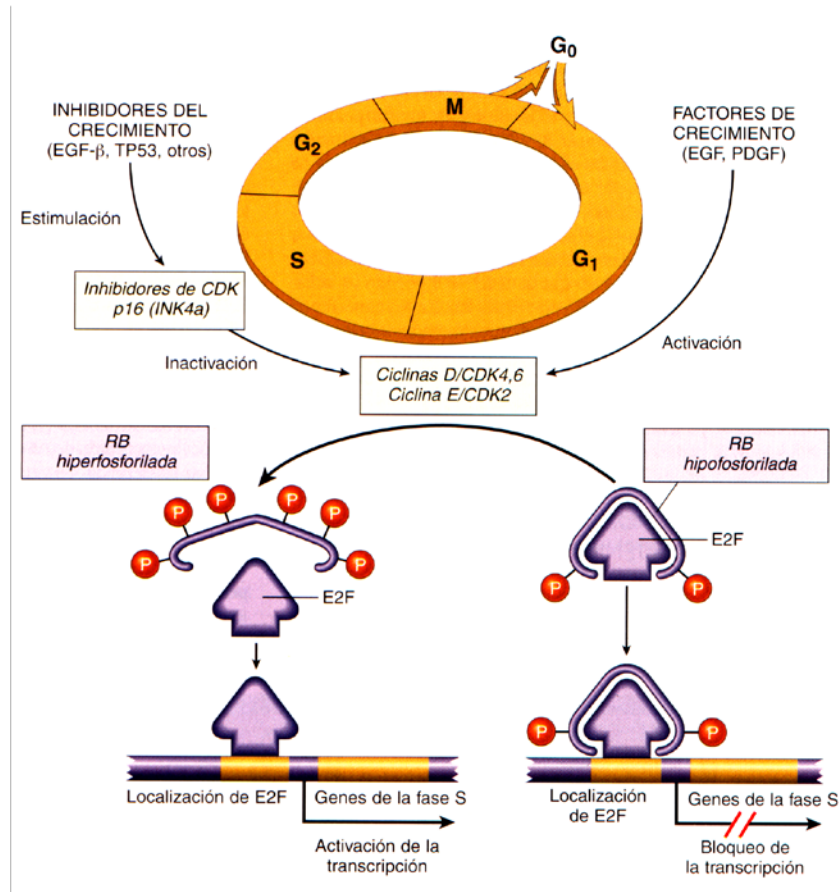
control llamado punto de restricción R. Durante la fase S se produce la duplicación del ADN y antes de entrar en la mitosis existe otro intervalo conocido como fase G2. En la fase M se produce el reparto equitativo del ADN entre las células hijas.²⁴

La maquinaria básica del ciclo celular está constituida por enzimas denominadas quinasas o proteína quinasas, capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato. El resultado de la fosforilación de una proteína es generalmente un cambio en su actividad. Las quinasas que coordinan los procesos de control del ciclo celular se denominan quinasas dependientes de ciclinas o CDKs porque su actividad de fosforilar proteínas está regulada por su asociación reversible a otras proteínas llamadas ciclinas. Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs. El control se ejerce a distintos niveles, sobre la transcripción de los genes de las ciclinas, su degradación y sobre la modificación de las CDKs por fosforilación e inhibición de su actividad.^{24,25}

Cuando la célula sale de la fase G0 y entra en la fase G1, comienza a sintetizar ciclinas para entrar en la fase S. Las ciclinas que regulan el punto de restricción R en la fase G1 son de dos tipos, D y E. Las ciclinas de tipo D, llamadas D1, D2 y D3, se unen a varias quinasas dependientes de ciclina: CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6 formando complejos binarios, pero principalmente lo hacen CDK4 y CDK6. Una de las funciones básicas del complejo ciclina D-CDK4 es fosforilar la proteína del retinoblastoma (Rb) (producto del gen supresor de tumores Rb) y activar así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S. Cuando la proteína Rb está hipofosforilada se une e inhibe a varias proteínas, entre ellas algunos factores activadores de la transcripción como E2F, que controlan la expresión de genes críticos para la síntesis de ADN. De esta forma, Rb bloquea la progresión de las células, manteniéndolas en fase G1. Sin embargo, tras su fosforilación en fase G1, pRb es inactivada y ya no es capaz de unir y bloquear a estos factores activadores, promoviendo la entrada de la célula en la fase S. Al final de la fase M, pRb vuelve a su estado hipofosforilado por acción de fosfatasas. Es decir, el nivel de fosforilación de pRb modula su interacción con los E2F, factores de transcripción necesarios para la progresión de la fase S. Así, cuando el nivel de fosforilación de pRb es bajo (fases G0/G1), Rb inhibe la acción activadora de E2F formando complejos Rb-E2F y de esta forma, bloquea la progresión de las células; sin embargo, cuando el nivel

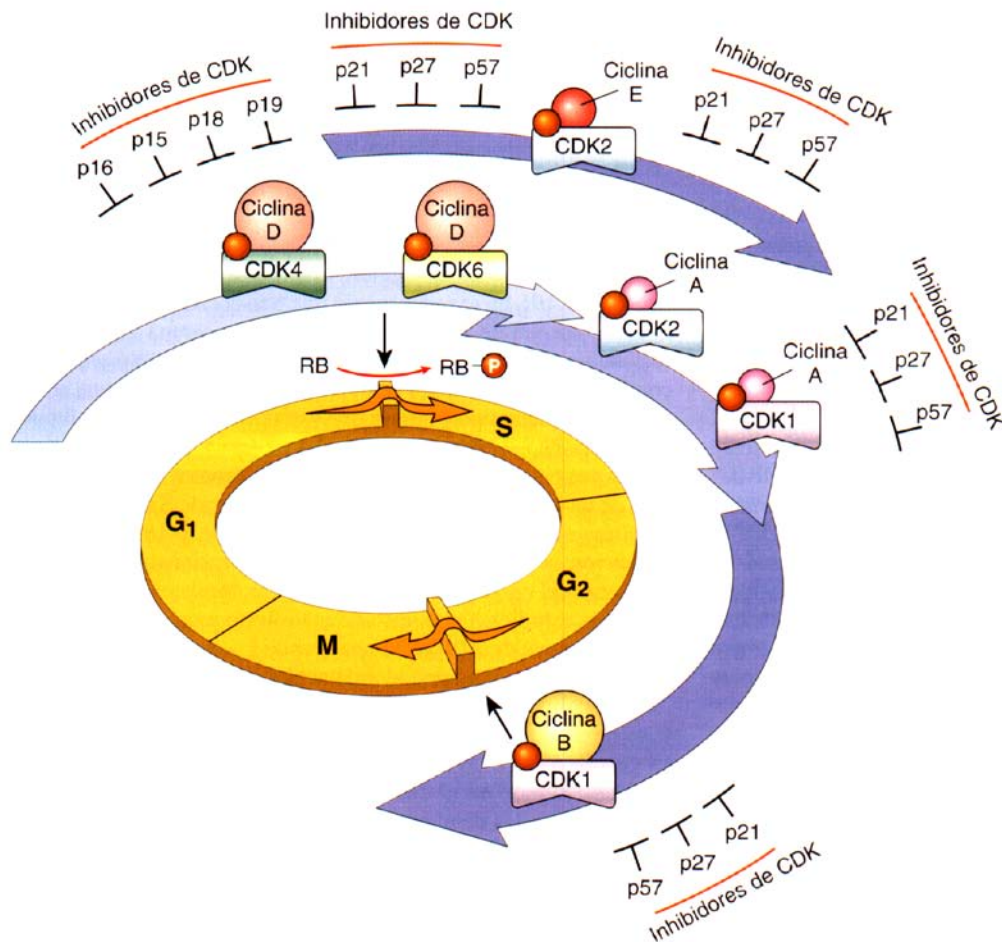
de fosforilación de Rb es alto (fases S/M), E2F se libera y activa la transcripción de genes que son cruciales para la proliferación.²⁶ (Figura 8)

Figura 8. Papel de la proteína Rb en la regulación del punto de control G1-S del ciclo celular (Kumar y cols, 2008).²⁶

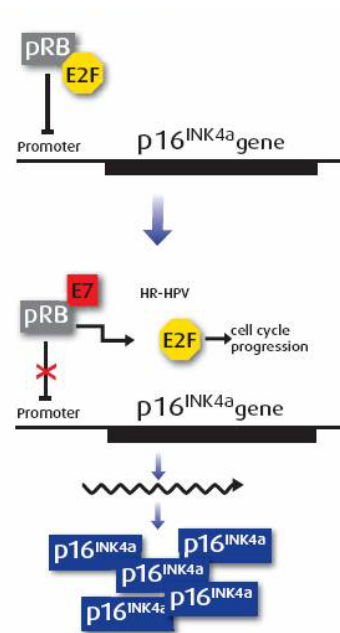


Existe un mecanismo de regulación de los complejos ciclina-CDK que juega un papel crucial en la regulación del ciclo celular: la unión de proteínas que inhiben directamente la actividad quinasa. Estas proteínas se denominan inhibidores de complejos ciclinas-CDK o CDKIs. Se conocen dos clases que difieren en estructura, mecanismo de inhibición y especificidad. La primera está compuesta por las proteínas p21, p27 y p57 y la segunda clase está compuesta por las proteínas p16, p15, p18 y p19, que forman complejos con las CDK4 y CDK6 inhibiendo su unión a las ciclinas D. Estas proteínas funcionan como supresoras de tumores por su efecto bloqueante en el ciclo celular.²⁶ (Figura 9)

Figura 9. Representación esquemática del papel de las ciclinas en el control del ciclo celular (Kumar y cols, 2008).²⁶



El gen p16 está localizado en la región 21 del brazo corto del cromosoma 9 y es responsable de codificar la proteína p16. Es un importante regulador del ciclo celular, y también se denomina también *MTS-1* (*Major Tumor Supresor*), *INK4a* (inhibidor de quinasa 4 dependiente de ciclina) o *CDK4I*. En 1994, dos grupos de investigación describieron por primera vez alteraciones de p16 en varias líneas celulares humanas.^{27,28} La proteína p16 forma un complejo con CDK4 y CDK6 e inhibe la formación de ciclina D-CDK4/6, evitando la fosforilación de pRb y la progresión del ciclo celular. Como se indicó anteriormente, el mecanismo de acción oncogénica del VPH está condicionado por la unión de la proteína E7 del VPH a pRb lo que determina la inactivación y la subsiguiente sobreexpresión de p16 (Figura 10).

Figura 10. Mecanismo de acción de E7 de VPH sobre pRb y sobreexpresión de p16.

De esta manera, p16 ha demostrado ser un marcador sensible y específico relacionado con la infección por serotipos virales de alto riesgo, como lo demuestran numerosos estudios en la literatura.^{23,29} Así, el estudio de la expresión de p16 en biopsias de cérvix uterino puede ayudar a identificar de forma precisa neoplasias intraepiteliales relacionadas con la infección por VPH de alto riesgo, con la ventaja, además, de reducir la variabilidad interobservador, e incluso intraobservador, que ocurre frecuentemente en la interpretación de estas lesiones. Asimismo, diversos estudios han demostrado que el análisis de la expresión de p16 puede contribuir a la predicción del riesgo de progresión en estas lesiones.³⁰

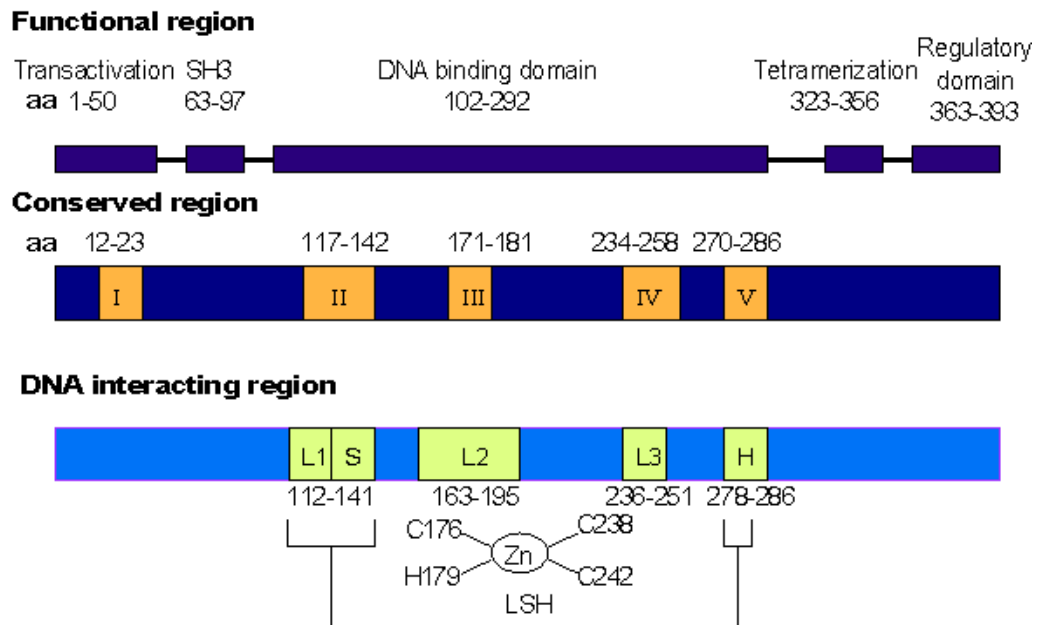
1.9.-Proteína p53.

La proteína p53, codificada por el gen supresor tumoral *TP53*, es una fosfoproteína que se localiza en el núcleo celular. Esta proteína fue descubierta a finales de la década de los 70 e identificada como una fosfoproteína celular capaz de unirse al antígeno transformante SV40 T, una propiedad que también es compartida por pRb.³¹

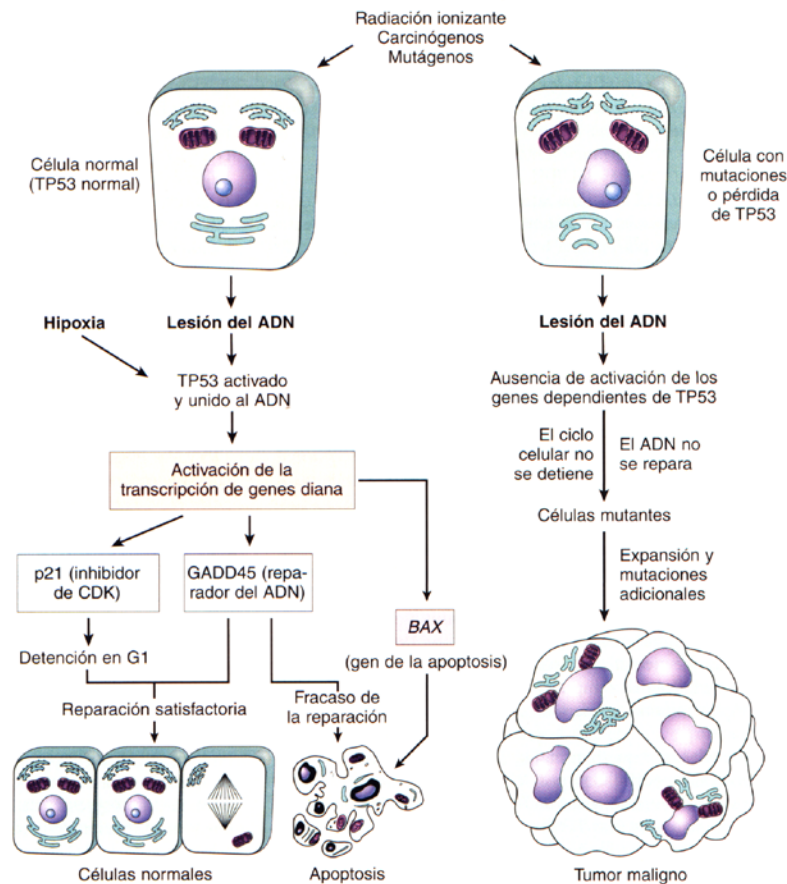
El gen *TP53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13 (17p13.1), y tiene aproximadamente 20 kb. Consta de 11 exones y produce un transcrito

de ARNm de 2,8 Kb cuyo resultado es una proteína de 53 kD que tiene 393 aminoácidos.³¹ (Figura 11)

Figura 11. Representación esquemática de la estructura del gen *TP53*.



El análisis de los niveles del ARNm de p53 sugiere que el gen se expresa en todos los tejidos corporales durante el desarrollo. La proteína se expresa en el núcleo celular y tiene una vida media muy corta en los tejidos normales. En tejidos normales está presente en cantidades muy pequeñas que no pueden ser detectadas por técnicas de inmunohistoquímica convencionales. Cuando el ADN está dañado, p53 se activa para mantener la integridad de la secuencia del ADN, bien por medio de la parada de la proliferación celular mientras el daño es reparado, o alternatively, dirigiendo la célula hacia la apoptosis. La proteína mutante pierde su función supresora tumoral, lo que constituye una etapa clave en la cascada neoplásica. Además, p53 es capaz de activar la vía apoptótica y, por tanto, su inactivación puede incrementar el número de células proliferantes así como su probabilidad de transformación neoplásica al inhibir la muerte celular programada.³² Por tanto, p53 es un factor de transcripción multifactorial, implicado en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del ADN y supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan al ADN.²⁶ (Figura 12)

Figura 12. Esquema de las funciones de p53 (Kumar y cols, 2008).²⁶

Desde su descubrimiento, la proteína p53 ha estado involucrada en la génesis de tumores. El principal mecanismo por el cual los VPH de alto riesgo inactivan p53 es a través de la inducción de la degradación por la vía ubiquitina proteasoma. En condiciones normales, los niveles de la proteína p53 son regulados por la ubiquitina ligasa E3 mdm2. Este mecanismo se encuentra bloqueado en infecciones virales y en otras condiciones de estrés celular. En cambio, la proteína E6 de los VPH de alto riesgo induce la degradación de p53 al formar un complejo con otra ubiquitina ligasa E3A, la E6AP.^{21,33}

Por tanto, el ADN del VPH de alto riesgo está frecuentemente integrado en el material genético de las células infectadas, por lo que no es extraño que ocurran errores que determinan una segregación cromosómica alterada y, en consecuencia, una situación denominada aneuploidia, relativamente frecuente en los procesos neoplásicos.

1.10.-Mitosis: anclaje de los cromosomas al huso y segregación.

Entender cómo las células mantienen constante el número apropiado de cromosomas después de cada división celular es una cuestión fascinante. A través del ciclo celular existen diferentes puntos de control (*checkpoints*) cuya función es asegurar que la segregación cromosómica tiene lugar de forma correcta. El punto de control principal se denomina *punto de control de mitosis*, de anafase o también punto de control del ensamblaje del huso (en inglés *Spindle Assembly Checkpoint*).

Para asegurar que la segregación cromosómica tiene lugar correctamente, las células han desarrollado un mecanismo preciso y complejo. En primer lugar, las células deben coordinar la duplicación del centrosoma con la replicación del ADN; un fallo en esta coordinación producirá inevitablemente la formación de husos monopolares o multipolares, que generalmente provocarán una segregación cromosómica anormal dado que en este caso, los cromosomas no se distribuirán de forma equilibrada entre las células hijas.³⁴

Durante la fase de síntesis (fase S) del ciclo celular, el centrosoma comienza a duplicarse, de modo que al inicio de la mitosis ambos centriolos de cada centrosoma alcanzan su longitud máxima, los centrosomas reclutan material adicional y su capacidad de nucleación de microtúbulos aumenta. A medida que progresa la mitosis, ambos centrosomas se separan para establecer el huso mitótico. De esta forma, el huso de una célula mitótica tiene dos polos de los que surgen los microtúbulos. Los microtúbulos son largos filamentos protéicos con dos extremos asimétricos, un extremo "menos" (-) relativamente estable cercano al centrosoma, y un extremo "más" (+) que sufre fases alternadas de crecimiento-retroceso y que explora el centro celular. Cada cromátida contiene una región especial, el centrómero, sobre la que se ensambla una estructura proteica denominada cinetocoro, capaz de estabilizar microtúbulos.^{35,36} En ocasiones, uno de los dos cinetocoros hermanos puede anclarse simultáneamente a microtúbulos generados por ambos polos, una configuración denominada merotética, que no se detecta por el punto de control de mitosis pero puede generar cromosomas retrasados en anafase y consecuentemente aneuploidía.³⁷

Recientemente, se ha prestado mucha atención al centrosoma, que en las células normales parece dirigir los cambios requeridos para una segregación cromosómica

adecuada. Sus funciones incluyen: (a) servir como anclaje para la enucleación de los microtúbulos; (b) servir como centro de organización para la transformación de los microtúbulos en el aparato del huso mitótico y, (c) servir como plataforma para el reclutamiento de las proteínas estructurales, motoras y catalíticas que constituyen el complejo del centrosoma.³⁸ Estas funciones de los centrosomas parecen estar reguladas por varias quinasas y, entre ellas, se ha postulado que los miembros de la familia de las Aurora quinasas juegan un papel determinante en la duplicación de los centrosomas, la segregación de los cromosomas y la citocinesis.

1.11.-Aurora quinasas.

Constituyen una familia de quinasas de tipo serina-treonina que incluye 3 miembros, denominadas **Aurora A** (Aurora, AURKA, Aurora-2, AIK, AIR-1, AIRK1, AYK1, BTAK, Eg2, MmIAK1 and STK15), **Aurora B** (Aurora-1, AIM-1, AIK2, AIR-2, AIRK-2, ARK2, IAL-1 and STK12) y **Aurora C** (AIK3).³⁹

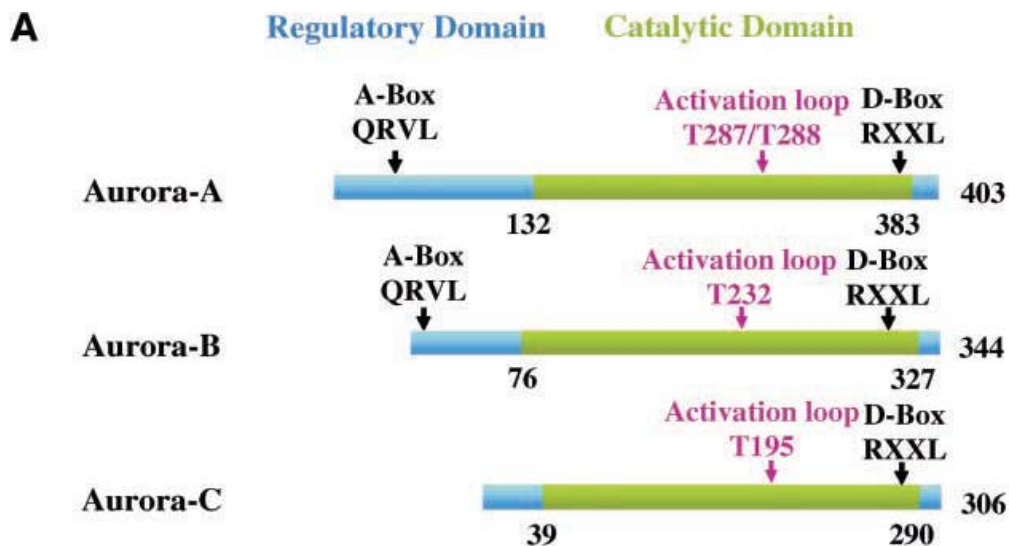
La primera de las Auroras fue descubierta en *Drosophila*, donde se observó una mutación que resultó en un fallo en la separación de los centrosomas, ocasionando la formación de huso monopolar (de ahí el nombre de “Aurora”, ya que la imagen observada recuerda a la aurora boreal).⁴⁰ El descubrimiento de esta familia de genes ha despertado un gran interés debido a que su alteración produce anomalías en la mitosis.

El gen de la Aurora A se localiza en la región 20q13, frecuentemente alterada en neoplasias humanas.⁴¹ Aurora B regula fundamentalmente la citocinesis y la arquitectura del cromosoma, por lo que se la ha denominado “*pasajera cromosomal*” mientras que Aurora C juega un papel importante en la espermatogénesis, además de cooperar con la Aurora B en el ensamblaje del huso mitótico.⁴²

1.11.1.-Estructura y localización de las Aurora quinasas.

Las Aurora quinasas tienen un tamaño que oscila entre 309 y 403 aminoácidos. El extremo carboxilo comparte un 70% de homología entre los tres miembros de la familia. Existe una caja D (*D-Box*) en el extremo carboxilo y una caja A (*A-Box*) en el extremo amino, responsables de la degradación de la proteína (Figura 13). La fosforilación en el aminoácido treonina en el dominio catalítico es necesaria para la actividad quinasa.⁴³

Figura 13. Representación esquemática de la estructura de las Aurora quinasas. Estas proteínas contienen dos dominios; un extremo amino (*azul*) regulador y uno carboxilo (*verde*) catalítico. Las tres presentan homología en la porción catalítica pero difieren en el extremo amino y una pequeña secuencia carboxilo terminal (*azul*). La fosforilación de treonina es necesaria para la actividad catalítica (*rojo*). Además, dos cajas (*box*) son necesarias para la degradación de la proteína (Fu y cols, 2007).⁴³



A pesar de las similitudes en la secuencia estructural, las Aurora quinasas son completamente diferentes en lo que respecta a su localización intracelular. La Aurora A se localiza en la zona pericentriolar desde el final de la fase S al comienzo de la siguiente fase G1 y se ubica en los polos de los microtúbulos del huso durante la mitosis. En contraste, la Aurora B se localiza en la porción media y persiste en la placa central hasta que ocurre la citocinesis. Además forma un complejo con otras proteínas como INCENP, survivina y borealina (denominadas también “*pasajeras cromosomales*”).

Las Auroras quinasas tienen diversos sustratos, localización y funciones.^{39,44-46} (Tabla 2 y Figuras 14 y 15).

Tabla 2. Sustratos y localización subcelular de las Aurora quinasas (adaptado de Bolanos-Garcia VM, 2005).³⁹

	Sustrato	Localización
Aurora A	PP1, p53, Cdh-1, TPX-2,	Huso mitótico
	RasGAP, Ajuba	Centrosoma.
Aurora B	Histona H3, INCENP, CENP-A,	Centrosoma
	desmina, Rec-8, vimentina,	Huso central
	MCAK, survivina	Cromosomas
Aurora C	Aurora B, INCENP	Huso central
		Cromosomas

Figura 14. Fases del ciclo celular y sitios de acción de Aurora A y Aurora B con indicación de los sustratos fosforilados de cada fase del ciclo celular por cada quinasa (los círculos amarillos corresponden a los sustratos de Aurora A y los verdes de Aurora B) (Gautschi y cols, 2008).⁴⁴

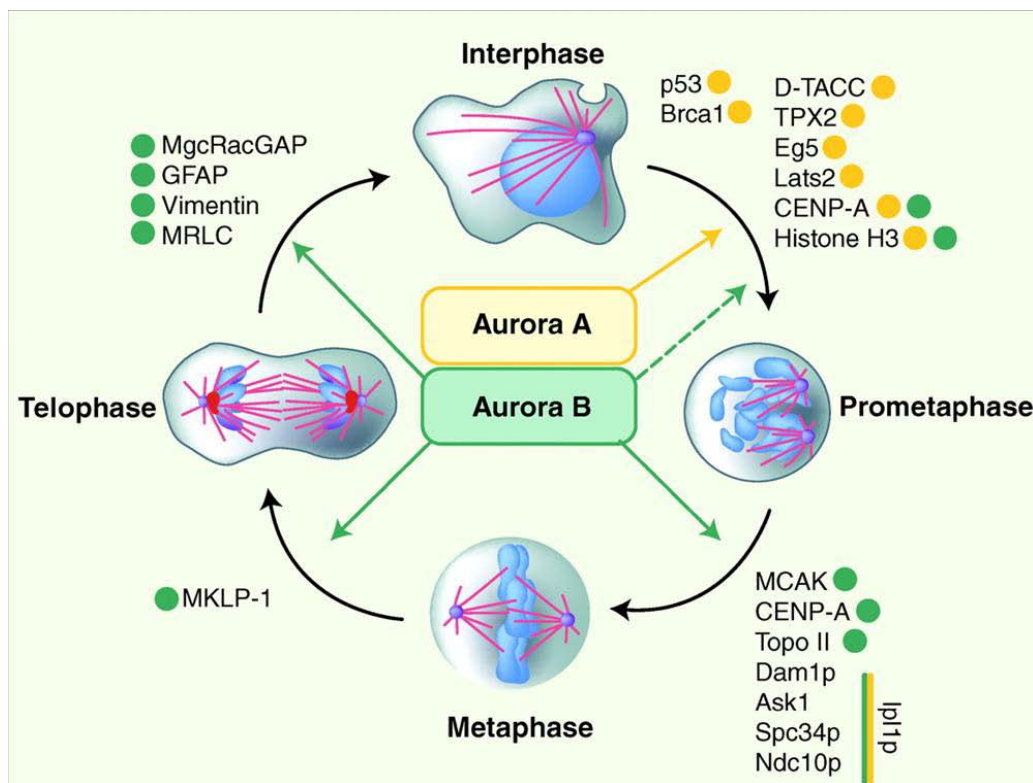
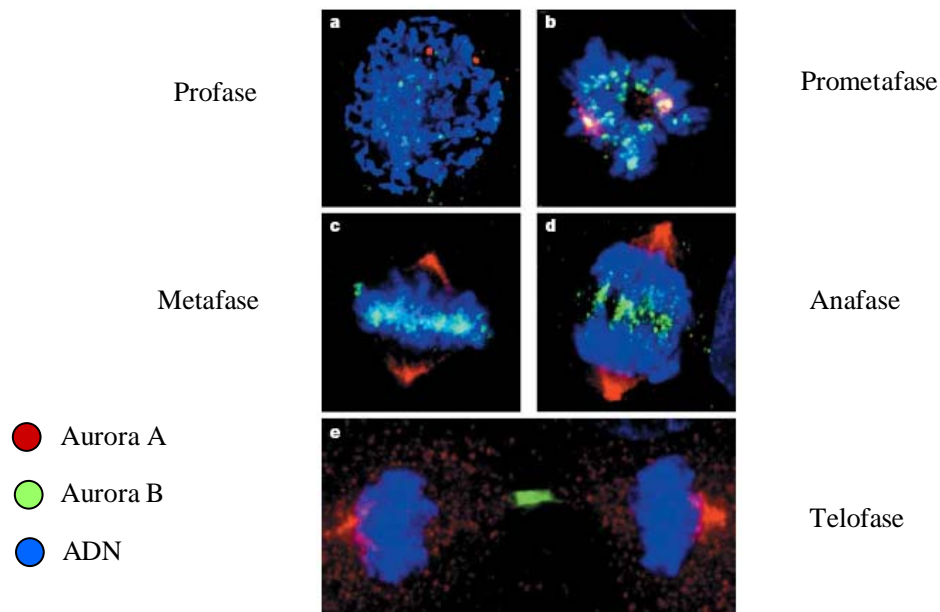


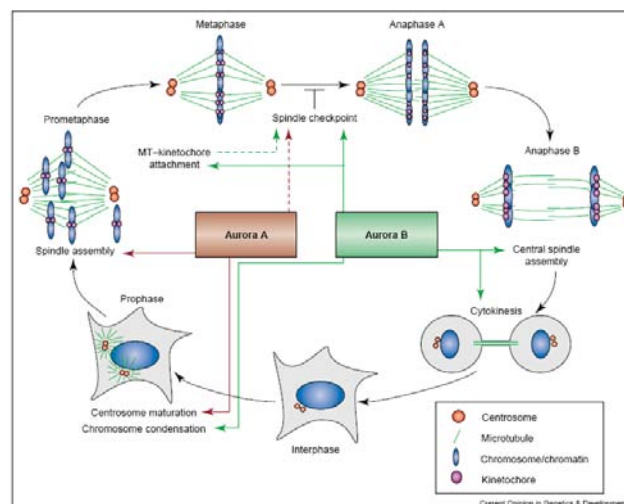
Figura 15. Localización de Aurora quinasas durante las fases del ciclo celular. Aurora A regula principalmente la formación del huso mitótico y la duplicación centrosómica, mientras que Aurora B regula la segregación cromosómica y la citocinesis (adaptado de Keen y cols, 2004).⁴⁵



1.11.2.-Funciones de las Aurora quinasas.

La Aurora A está principalmente comprometida en la formación del centrosoma, inicio de la mitosis y ensamblaje del huso mientras que Aurora B participa en las modificaciones de la cromatina, la unión de microtúbulos a cinetocoros, control de la formación del huso y la citocinesis, además de fosforilar la histona H3 en Ser¹⁰ y Ser²⁸.⁴⁷ (Figura 16)

Figura 16. Representación esquemática de las principales funciones de Aurora A y Aurora B.⁴⁷



La actividad de las Auroras está regulada estrictamente durante la mitosis. Aurora A alcanza el máximo de actividad entre la transición de las fases G2-M, mientras que la actividad de Aurora B persiste desde la metafase hasta el final de la mitosis. Los mecanismos de regulación de estas proteínas están controlados por complejos procesos de fosforilación y degradación. Aurora A es activada principalmente por Ajuba y TPX2, así como otra proteína fosfatasa inhibidora-2. Aurora B está regulada por otros miembros del complejo de proteínas pasajeras, fundamentalmente por la proteína interna del centrómero (INCENP), survivina y borealina.⁴² Esas proteínas forman un complejo que se localiza en los cinetocoros desde la profase a la metafase y en el centro del huso en la citocinesis.

1.11.3.-Aurora quinasas y su relación con tumores.

La participación de Aurora A en el desarrollo de tumores se puso de manifiesto inicialmente en estudios *in vitro*. La sobreexpresión de Aurora A determinó la transformación en células NIH3T3 y Rat-1 y la formación de tumores en ratones.^{48,49} Este proceso es dependiente de la actividad quinasa, ya que no se produce en presencia de Aurora A defectiva. No así el aumento en el número de centrosomas, que se produce de manera independiente del estado de Aurora A. Por otro lado, la sobreexpresión de Aurora A en células HeLa y en fibroblastos produce un aumento en el número de células poliploides.⁵⁰ Estos mismos estudios también han demostrado que la sobreexpresión de Aurora A produce inestabilidad cromosómica por la alteración del proceso mitótico, induciendo fallos en las uniones entre los microtúbulos y los cinetocoros. Aunque estas alteraciones son detectadas por las proteínas que regulan el punto de control del ensamblaje del huso mitótico, la sobreexpresión continuada de Aurora A sobrepasa la función de las mismas y permite a las células entrar en anafase facilitando una incorrecta segregación de los cromosomas. Además, aunque Aurora A no está implicada directamente en el proceso de citocinesis, las alteraciones mitóticas son responsables de que la citocinesis no ocurra de forma correcta, por lo que la aneuploidía en estas células puede ser la consecuencia de defectos en la división celular y subsiguiente tetraploidización.^{50,51}

Estudios *in vivo* han demostrado la implicación de Aurora A en una gran variedad de neoplasias. Aurora A fue aislada por primera vez como producto del gen *BTAK* (*Breast Tumor Amplified Kinase*, también llamado *STK15*) en el cromosoma

20q13, una región que está amplificada en los tumores primarios de mama, cáncer colorectal y otros como ovario, próstata y neuroblastoma. La expresión elevada de Aurora A ha sido detectada en más del 50% de tumores colorectales y en un 94% de los carcinomas ductales infiltrantes de mama. En cáncer de ovario, la amplificación de Aurora A se ha descrito en el 33% de líneas celulares⁵² y en el 21% de carcinomas primarios.⁵³ Este último estudio sólo incluía 24 carcinomas de ovario esporádicos y todos los casos con amplificación de Aurora A fueron carcinomas serosos (3 casos) o indiferenciados (2 casos). Más recientemente, Gritsko y cols⁵⁴ han analizado la sobreexpresión y activación de Aurora A en un grupo de 92 carcinomas de ovario de distinto estadio y tipo histológico, incluyendo tumores *borderline*, encontrando aumento de la actividad quinasa de Aurora A en el 48% de los tumores y aumento de expresión inmunohistoquímica en el 57% de los casos. Aunque el estudio no encontró una relación entre la actividad quinasa y las características clínico-patológicas, la sobreexpresión fue significativamente más frecuente en estadios bajos y tumores no infiltrantes, lo que contrasta con los resultados observados en otras neoplasias. Mendiola y cols⁵⁵ investigaron la expresión de Aurora A y B por inmunohistoquímica en una serie de 68 carcinomas de ovario para analizar su valor pronóstico y encontraron expresión de Aurora A en el 58,6% y de Aurora B en el 85,3% de los carcinomas, respectivamente; el 27,6% de los casos examinados demostró amplificación del gen de Aurora A mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Los casos con expresión de Aurora A y B mostraron aumento en el tiempo libre de enfermedad, con una menor tasa de recidiva tumoral en aquellos tumores con expresión de Aurora A. En el endometrio, Moreno-Bueno y cols⁵⁶ demostraron en una serie de carcinomas hasta un 60% de amplificación de Aurora A asociada a tumores de tipo no endometriode.

Un aspecto importante a considerar es la relación de Aurora A con otros genes supresores tumorales, especialmente con *TP53*, que facilita la viabilidad celular y la formación de tumores.⁵⁷⁻⁵⁹ Actualmente, se considera que la supresión de *TP53* induce la amplificación del centrosoma y la transformación celular.⁶⁰ La interacción entre Aurora A y p53 produce la fosforilación de p53 en el residuo Ser³¹⁵ facilitando su degradación por mdm-2 y, además, produce la fosforilación en Ser²¹⁵ resultando en la inhibición de su actividad.⁵¹

La contribución de la Aurora B al desarrollo tumoral ha sido menos estudiada que la de Aurora A. Aurora B se localiza en el cromosoma 17p13.1, una región que típicamente no está amplificada en tumores malignos. Sin embargo, la sobreexpresión de Aurora B se ha demostrado en una gran variedad de neoplasias, incluyendo glioblastoma multiforme⁶¹, mesotelioma maligno⁶², cáncer de colon (donde se correlaciona con estadios avanzados)^{63,64}, lesiones malignas hematológicas⁶⁵ y carcinomas de endometrio⁶⁶ y ovario.⁵⁵

1.12.-Survivina.

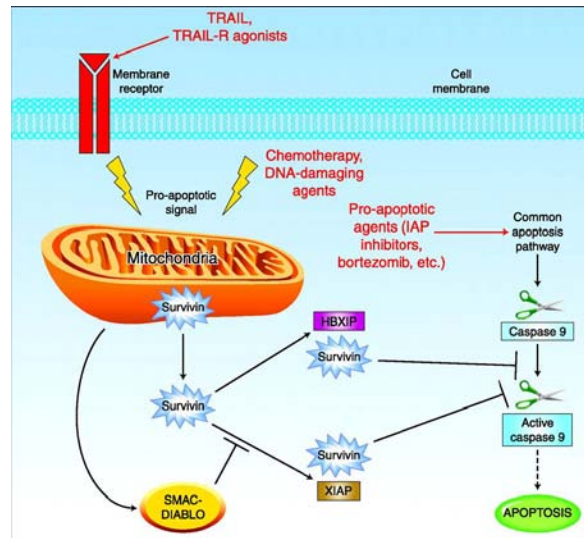
Como se ha explicado previamente, en las infecciones por VPH de alto riesgo el evento desencadenante de la transformación neoplásica es la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped, lo que determina la disrupción de la región E2 del virus y produce en definitiva la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 que interfieren con la vía de pRb y p53, evitándose de este modo la apoptosis de la célula transformada. La inhibición de la apoptosis es, por tanto, uno de los eventos claves en la transformación maligna.

Durante la apoptosis, el ADN cromosómico es fragmentado como resultado de la escisión entre nucleosomas. La cromatina se condensa y, a continuación, el núcleo se disgrega en pequeños fragmentos, la célula encoge y se rompe en fragmentos rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son reconocidos de forma eficaz y fagocitados por los macrófagos.²⁴

Actualmente, se sabe que una familia de proteasas, denominadas caspasas, son los últimos efectores o ejecutores de la muerte celular programada.⁶⁷ Las caspasas están reguladas por una familia de proteínas entre las que se encuentra Bcl-2 y las denominadas IAP (*proteínas inhibidoras de apoptosis*). Los miembros de la familia IAP interaccionan directamente con las caspasas y suprimen la apoptosis inhibiendo su actividad o dirigiéndolas a su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. La survivina es el miembro más pequeño de la familia de las IAP y contiene 142 residuos de aminoácidos. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado su papel en la inhibición de la muerte celular programada. Además de la acción de inhibir la función de las caspasas, también se ha descrito que puede contrarrestar el efecto de mediadores

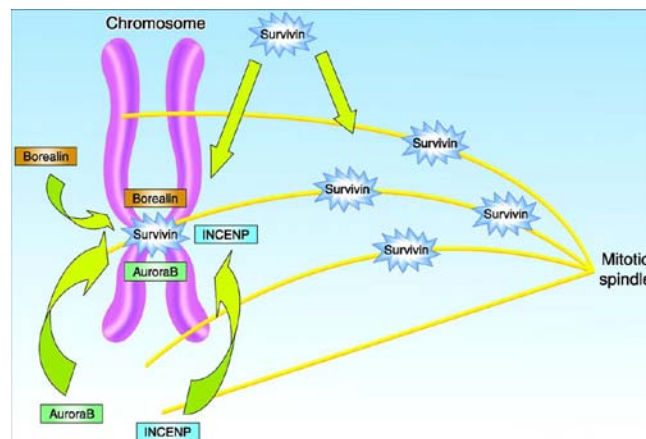
de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis incluyendo IL-3, FAS, TRAIL y p53, así como interactuar con SMAC/DIABLO.^{68,69} (Figura 17)

Figura 17. Función de la survivina como inhibidor de la apoptosis. Tras la activación de señales pro-apoptóticas, la survivina es liberada de la mitocondria al citosol e inhibe la caspasa 9. Esta función requiere la asociación con HBXIP y XIAP (Mita y cols, 2008)⁶⁹



La expresión de survivina está altamente regulada en el ciclo celular: se expresa en la fase G2-M donde se asocia a los centrómeros y luego se localiza en la zona media del huso durante la anafase/telofase, para desaparecer al final de la telofase.^{69,70} (Figura 18)

Figura 18. Función de la survivina en la mitosis. La survivina es un componente de las proteínas pasajeras y es esencial para la adecuada segregación de los cromosomas y la citocinesis. Además, también participa en la polimerización de la tubulina y con ello contribuye a la dinámica de los microtúbulos (Mita y cols, 2008).⁶⁹



A diferencia de las otras proteínas IAP, survivina se expresa durante el desarrollo embrionario y fetal siendo indetectable en tejidos adultos normales. Desde su descubrimiento en 1997, la survivina ha sido estudiada en diversas neoplasias. Así, se ha descrito su sobreexpresión en muchos tumores malignos, incluyendo pulmón, colon, mama, cerebro, estómago, esófago, páncreas, hígado, próstata y neoplasias hematológicas.⁷¹⁻⁷³ Además, se ha sugerido que la expresión de survivina en las células tumorales puede servir como un predictor potencial de transformación maligna en lesiones precancerosas. En este sentido, Lo Muzio y cols⁷⁴ utilizando técnicas de inmunohistoquímica, demostraron la presencia de survivina en el 33% de lesiones orales sin progresión maligna y en el 94% de lesiones que evolucionaron a carcinoma escamoso. Numerosos estudios postulan que la sobreexpresión de survivina está asociada con incremento del grado de malignidad y disminución de la supervivencia en diferentes tumores, como el de mama, el carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, esófago y linfoma no Hodgkin B.⁷⁵⁻⁷⁸ Otros estudios plantean que la localización intracelular de la survivina es importante para el pronóstico del paciente ya que la expresión citoplasmática parece no correlacionarse con la supervivencia mientras que la expresión nuclear es un marcador sensible en este sentido. En varios tumores, incluido el carcinoma de páncreas, se ha descrito la localización nuclear de la proteína en las lesiones de alto grado, sugiriendo que existe una translocación de esta proteína del citoplasma al núcleo, lo que se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna.⁷⁹ Shirai y cols⁸⁰ investigaron la relación de la expresión inmunohistoquímica de survivina en pacientes con glioblastoma y la tasa de supervivencia a 3 años en los pacientes con expresión nuclear fue significativamente menor en estos pacientes en comparación con los pacientes con expresión baja o moderada (0% frente a 11,6%, respectivamente). Sin embargo, la expresión citoplasmática no se correlacionó con el pronóstico.

Diferentes estudios señalan que la expresión de survivina podría tener un papel importante en la carcinogénesis del cuello uterino. Frost y cols⁸¹ en muestras de mucosa de cuello uterino normal, en displasias y en carcinomas infiltrantes observaron un patrón de expresión inmunohistoquímico diferente en cada categoría, reconociendo expresión intensa en células con metaplasia escamosa inmadura y en aquellas que mostraron clara evidencia morfológica de infección por VPH. Saitoh y cols⁸² usando *Northern blot* encontraron niveles de expresión de ARNm de survivina dos veces

superiores a los del tejido cervical normal. Branca y cols⁸³ sugieren que la expresión de survivina podría ser un marcador temprano en la carcinogénesis cervical y que la intensidad de tinción se incrementa con la progresión de las neoplasias intraepiteliales.

1.13.-Proteína Ki67.

La proteína Ki67 fue identificada por Gerdes y cols en 1991⁸⁴ como una proteína nuclear no histona. La ausencia de expresión de Ki67 en células quiescentes y su expresión universal en los tejidos proliferantes ha originado un gran interés sobre su papel potencial como un marcador de la proliferación celular. En este sentido, Ki67 es uno de los marcadores moleculares que se ha investigado más extensamente con miras a proporcionar información temprana y precisa de la actividad proliferativa de las células tumorales, dado que ésta es una característica clave en la progresión de tumores. La fosforilación y defosforilación de la proteína Ki67 coincide con el paso de las células en la mitosis y es controlada por el complejo ciclina B/ cdc2.⁸⁵

La expresión exclusiva de Ki67 en células en proliferación ha hecho de los anticuerpos contra Ki67 una herramienta de gran valor para determinar la proliferación tumoral en la investigación sobre el cáncer. La expresión de Ki67 generalmente se calcula como el porcentaje de células tumorales con expresión nuclear de la proteína.⁸⁶

Sahebali y cols⁸⁷ sugieren la utilidad de Ki67 como parte del panel de procedimientos para complementar la identificación y diagnóstico del cáncer cervical y sus lesiones precursoras. En estos casos, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de Ki67 se utiliza fundamentalmente para discriminar entre lesiones de bajo y alto grado (NIC I/II-III).⁸⁸ La expresión de Ki67 está normalmente limitada a las capas basales y parabasales del epitelio cervical escamoso normal. En displasias y carcinomas, la expresión se extiende más allá del tercio basal y aumenta el número de células positivas.⁸⁷ Por otra parte, la interacción de las oncoproteínas virales de los VPH de alto riesgo con las proteínas reguladoras del ciclo celular p53 y pRb que ocurre en la neoplasia cervical, puede verse reflejada por una expresión anormal de Ki67.^{89,90}

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1.-HIPÓTESIS.

Las proteínas p16, p53, Ki67, Aurora-A, Aurora-B y survivina juegan un papel importante en los mecanismos de regulación y control del ciclo celular y la alteración de su expresión influye en la progresión de las neoplasias intraepiteliales del cérvix uterino, de tal manera que a mayor progresión de la neoplasia intraepitelial cervical mayor será la inmunoeexpresión de estas proteínas. El mejor conocimiento de la biología de estas lesiones basado en la expresión de estas proteínas contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de prevención del carcinoma de cérvix uterino.

2.2.-OBJETIVOS.

- 1) Describir la inmunoeexpresión de las proteínas p16, p53, Ki67, Aurora A, Aurora B y survivina en la neoplasia intraepitelial del cérvix uterino.

- 2) Determinar semicuantitativamente la intensidad y el porcentaje de inmunomarcage celular de estas proteínas en la progresión de la neoplasia intraepitelial del cérvix uterino.

- 3) Correlacionar el patrón de expresión de las proteínas estudiadas en relación a la progresión de la neoplasia intraepitelial del cérvix uterino.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

En este estudio, transversal y experimental, se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica de una serie de moléculas implicadas en los mecanismos de control del ciclo celular y en la progresión neoplásica de las lesiones preinvasoras de cuello uterino.

3.1.-MATERIAL.

Se seleccionaron un total de 70 casos correspondientes a biopsias y piezas de conización de cuello uterino con los diagnósticos de neoplasia intraepitelial (n=67), carcinoma condilomatoso (n=1) y carcinoma microinvasor (n=2). Los casos fueron seleccionados de manera aleatoria del archivo de la Sección de Patología Ginecológica del Instituto Anatomopatológico “Dr. José A. O’Daly” de la Universidad Central de Venezuela.

3.2.-MÉTODOS

3.2.1.-Procesamiento de las muestras y tinciones histológicas.

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10% y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que posteriormente fueron tñ con hematoxilina-eosina y ácido peryódico de Schiff (PAS). Todos los casos fueron revisados para confirmar el diagnóstico.

3.2.2.-Método inmunohistoquímico de la expresión proteica.

El estudio inmunohistoquímico se realizó en dos fases:

- ❖ **PRIMERA FASE** (Instituto Anatomopatológico “Dr. José A. O’Daly” de la Universidad Central de Venezuela). Realización de la técnica inmunohistoquímica para la determinación de p16, p53 y Ki67. En la Tabla 3 se incluyen los detalles de los anticuerpos utilizados.

Tabla 3. Detalles de los anticuerpos utilizados (primera fase del estudio).

Anticuerpo	Clon	Casa	Dilución
p16	484	Dako	1:50
p53	DO-7	Dako	1:50
Ki67	MIB1	Dako	1:50

Secciones histológicas de 4 micras de espesor representativas de los casos fueron montadas sobre portaobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina. La desparafinación del tejido se realizó mediante su inmersión en xilol fresco, seguido de rehidratación con pasos sucesivos de alcoholes de grado decreciente hasta agua desionizada. La recuperación antigénica se efectuó por calor (95-99°C por 40 minutos) mediante “baño de maría” (Isotemp 205; Fisher Scientific) para la proteína p16 y una vaporera de marca comercial (durante 30 minutos) para p53 y Ki67, dejando durante el procedimiento las láminas inmersas en solución de buffer citrato de pH 6.

La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó mediante la incubación de los cortes histológicos con solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 5 minutos. A continuación, se realizó un lavado con solución de tris buffer salino con Tween 20 (TBST) y seguidamente se incubaron los anticuerpos primarios sobre las secciones tisulares a temperatura ambiente durante una hora, seguido de lavado con TBST. Posteriormente, se utilizó el sistema de detección y amplificación EnVisión (Dako). Para ello se aplicó el anticuerpo secundario anti-anticuerpo primario de ratón conjugado a un polímero de dextrano marcado con peroxidasa de rábano blanco sobre los cortes histológicos durante 20 minutos. Luego de lavado con TBST, se aplicó la solución de peróxido de hidrógeno y 3,3-diaminobencidina (sistema DynaChrome; ThermoShandon) durante 10 minutos, seguido de lavado con agua corriente. Finalmente las secciones tisulares se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer, se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se montaron con la resina sintética DePex. Se utilizaron controles positivos del método.

- ❖ **SEGUNDA FASE** (laboratorio de Inmunohistoquímica del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz, Madrid, España). Realización de la técnica inmunohistoquímica para la determinación de la

expresión de las aurora quinasas A y B y survivina. En la Tabla 4 se incluyen los detalles de los anticuerpos utilizados.

Tabla 4. Detalles de los anticuerpos utilizados (segunda fase del estudio).

Anticuerpo	Clon	Casa	Dilución
Aurora A	JLM28	Novocastra	1:50
Aurora B	Policlonal	Abcam PCL	1:50
Survivina	Policlonal	Abcam PCL	1:400

La técnica inmunohistoquímica se realizó mediante el método Envision Flex (Dako). Brevemente, tras la desparafinización e hidratación de los tejidos en una serie de alcoholes decrecientes hasta el agua destilada se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena durante 10 minutos. A continuación, las muestras se lavaron con agua destilada y se realizó el desenmascaramiento antigénico utilizando el sistema PT Link (Dako). Posteriormente, las muestras se lavaron de nuevo en agua destilada y a continuación en tampón Tris pH=7,4 a temperatura ambiente. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario. Las muestras se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se añadió el anticuerpo secundario conjugado. Por último, las muestra se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina, durante 5 minutos. Con el fin de visualizar los núcleos, se realizó contratinción con hematoxilina. Este procedimiento se realizó utilizando el inmunoteñidor automático Autostainer Plus (Dako).

3.2.3.-Interpretación de los resultados de la inmunotinción.

- **p16, p53 y Ki67.** En el caso de la proteína p16 se valoró la expresión nuclear, con o sin expresión citoplasmática asociada. Para las proteínas p53 y Ki67 se valoró únicamente la expresión nuclear. Se realizó el conteo de 10 campos de gran aumento (40x). La valoración final se realizó de acuerdo a las siguientes criterios (Tabla 5):

Tabla 5. Interpretación de los resultados de la expresión inmunohistoquímica de p16, p53 y Ki67.

Grado	% de células marcadas	Espesor epitelial
-	Ausencia de tinción (0%)	
+	Menor del 25%	1/3
++	Entre el 25-75%	2/3
+++	Mayor del 75%	3/3

- **Aurora B y survivina.** Se evaluaron los siguientes parámetros:
 - Espesor del epitelio comprometido (es decir donde se observó inmunomarcaje)
 - Porcentaje de células marcadas (%).
 - Localización nuclear (N).
- **Aurora A.** Se evaluaron los siguientes parámetros:
 - Espesor del epitelio comprometido (es decir donde se observó inmunomarcaje).
 - Porcentaje de células que se tiñen con la inmunohistoquímica (%).
 - Intensidad de la inmunorreacción de acuerdo a la siguiente escala: *débil* (d), *moderada* (m) y *fuerte* (f).

3.2.4.-Análisis estadístico.

Los datos se recogieron en una tabla Excel 2007® para Windows 7® y se procesaron con los programas GraphPad® v.3.0 y SPSS® v.17.0. Las variables cuantitativas fueron analizadas como medias con sus desviaciones estándar (\pm DE). Las variables cualitativas fueron analizadas como proporciones (%). La comparación de las proporciones se realizó con la prueba de Chi cuadrado (χ^2). La comparación de valores cuantitativos se realizó con la prueba de *t* de Student si se cumplían los criterios para hacerla, si no, la prueba no paramétrica de *U* de Mann-Whitney. La concordancia entre las diferentes variables estudiadas se evaluó al cruzar los datos utilizando tablas de contingencia y posteriormente analizando la concordancia con la prueba de Kappa (κ), de acuerdo a los criterios de Landis y Koch:

- $\kappa \leq 0,4$ concordancia baja o pobre.
- $\kappa = 0,4-0,7$ buena concordancia.
- $\kappa \geq 0,7$ concordancia excelente.

Para comparar si existían diferencias en la edad media de las pacientes según el tipo de patología de cuello uterino, se realizó la prueba de ANOVA con evaluación post-test con la prueba de Tukey HSD, LSD y Bonferroni. La misma metodología se empleó para comparar el porcentaje de tinción celular con survivina, Aurora B y Aurora A.

Finalmente, dado que se incluyeron 6 marcadores, estos se analizaron por separado en relación con el tipo de patología y posteriormente se realizó un modelo de regresión logística multinomial donde se consideraron como factores predictivos de la patología a los marcadores p16, Ki67, p53, survivina, Aurora B y Aurora A, y como covariables de confusión a la metaplasia escamosa, la infección por VPH, la cervicitis crónica y la hiperplasia. Se calcularon las razones de verosimilitud y de significancia estadística para cada uno de los 6 marcadores.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza de 95%, considerándose una p significativa $<0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1.-Características de la muestra.

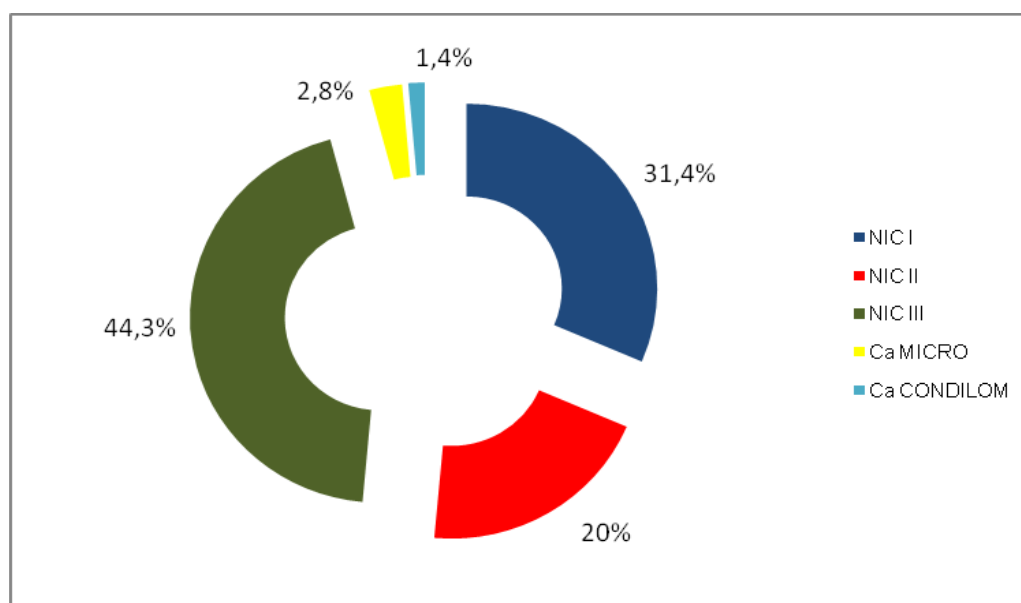
Se seleccionaron aleatoriamente 70 casos de biopsias y piezas de conización procedentes del archivo de la Sección de Patología Ginecológica del Instituto de Anatomía Patológica de la Universidad Central de Venezuela, Caracas (Venezuela). Las pacientes tenían una edad media de 33 años (rango, 17-53 años) (Tabla 6). La mayoría de las pacientes (67,2%) tenían edades comprendidas entre 20 y 39 años.

Tabla 6. Distribución de las pacientes según grupo etario.

Edad	Frecuencia (n=70)	Porcentaje
0-19	4	5,7
20-29	24	34,3
30-39	23	32,9
40-49	16	22,9
≥50	3	4,3

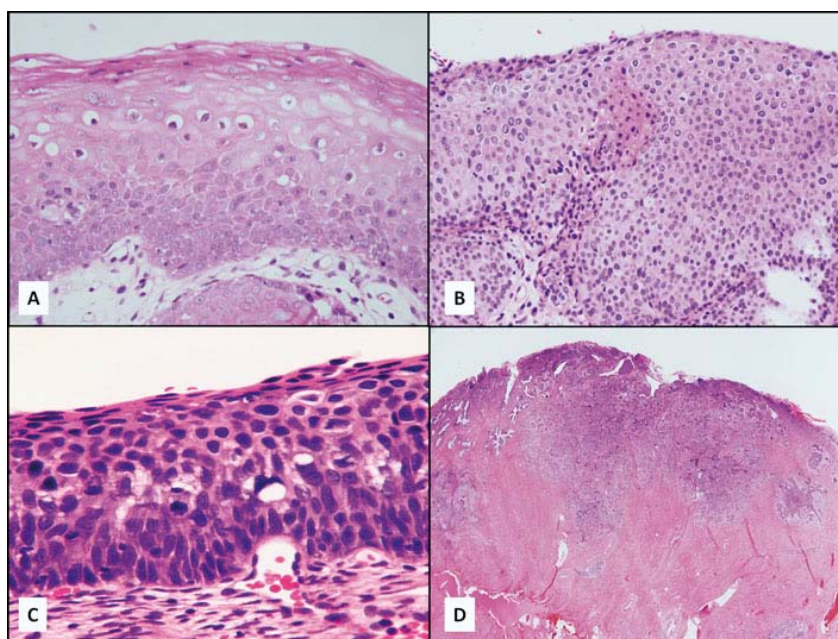
La casuística se distribuyó de la siguiente manera (Figura 19):

Figura 19. Distribución de las lesiones en la muestra estudiada.



Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) grado III representaron el 44,3% de los casos, el 20% correspondió a NIC II y el 31,4% a NIC I. Además, se incluyeron 2 casos (2,8%) de carcinoma microinfiltrante y 1 caso (1,4%) de carcinoma condilomatoso (Figura 20).

Figura 20. A) Lesión tipo NIC I-VPH (HE, 40x), B) Lesión tipo NIC II (HE, 20x), C) Lesión tipo NIC III (HE, 40x), D) Lesión tipo carcinoma microinfiltrante (HE, 4x).



La infección por VPH y la cervicitis crónica resultaron las patologías asociadas más frecuentes del total de la muestra, alcanzando valores de 94,3% y 97,1%; respectivamente. La edad promedio de las pacientes con infección por VPH (n=66), ($32,89 \pm 9,14$ años) fue menor que la edad promedio de las pacientes sin signos morfológicos de infección por VPH (n=4) ($34,5 \pm 9,88$ años).

La metaplasia escamosa inmadura fue un hallazgo más frecuente (65,7%) que la metaplasia escamosa madura (25,7%). En el 90% de los casos se encontró que los cambios de tipo metaplasia escamosa no difirieron significativamente en relación a la edad de la paciente ($p=0,799$), a pesar de que la edad promedio de las que presentaron metaplasia escamosa fue mayor ($33,08 \pm 9,05$ años) que la edad promedio de aquellas pacientes sin metaplasia escamosa ($32,14 \pm 10,31$ años).

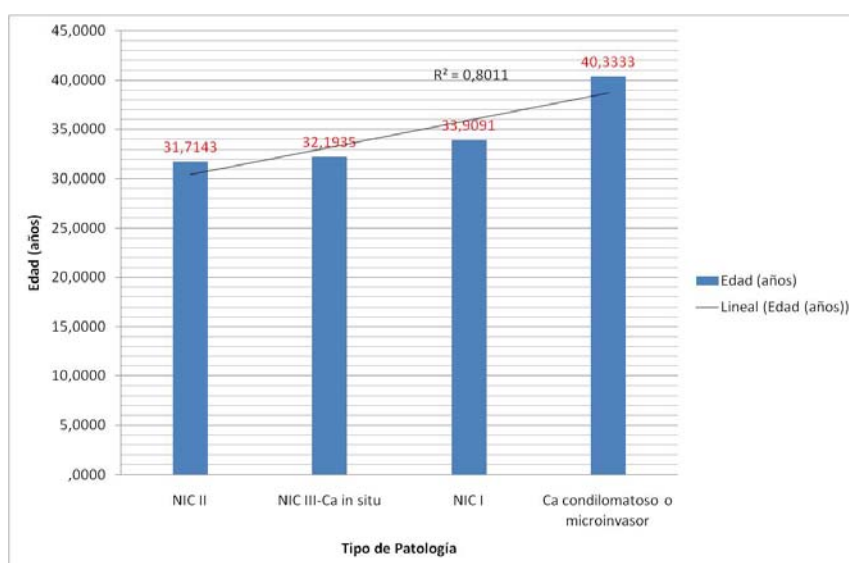
En relación a la hiperplasia de glándulas endocervicales, ésta sólo se observó en el 4,3% de las pacientes, sin relación alguna con la edad de las mismas ($p=0,482$). La Tabla 7 resume la distribución de todas las patologías presentes en la muestra

Tabla 7. Distribución de la muestra según el tipo de patología.

Lesión	Frecuencia	Porcentaje
NIC I	22	31,4
NIC II	14	20,0
NIC III-Carcinoma <i>in situ</i>	31	44,3
VPH	66	94,3
Carcinoma condilomatoso	1	1,4
Carcinoma microinfiltrante	2	2,8
Metaplasia escamosa madura	18	25,7
Metaplasia escamosa inmadura	46	65,7
Cervicitis crónica	68	97,1
Hiperplasia endocervical	3	4,3

Al analizar la distribución de las neoplasias intraepiteliales y carcinomas (microinfiltrantes y condilomatoso) según el grupo etario no se observaron diferencias significativas ($p=0,451$), aunque se apreció que pacientes con lesiones de mayor gravedad eran aquellas de mayor edad (Figura 21).

Figura 21. Distribución de la muestra según edad y tipo de lesión epitelial.



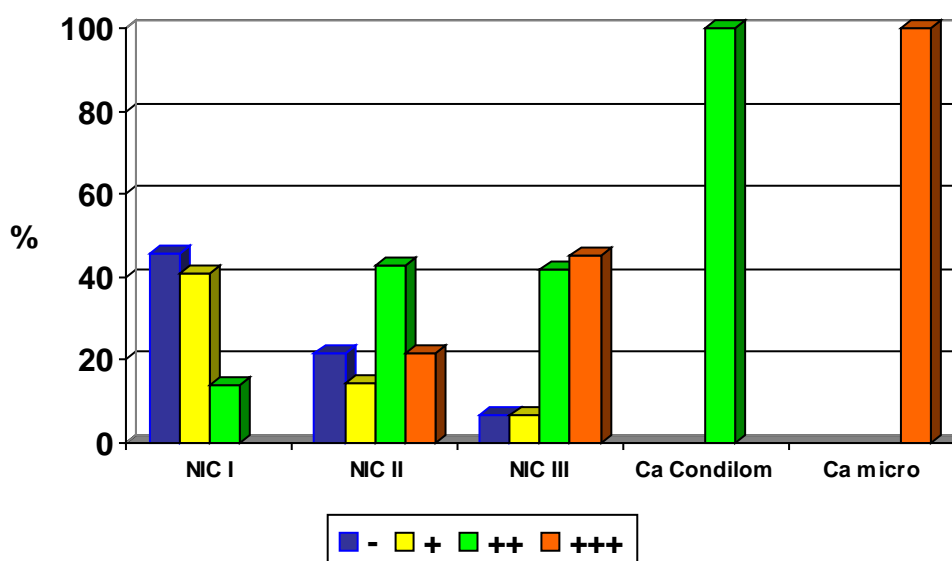
4.2.-Expresión inmunohistoquímica de p16.

Al analizar la inmunoexpresión de p16 en la muestra estudiada se observó que el 50% (n=11) de las NIC I resultaron negativas. En cambio, los casos de NIC II, NIC III y los carcinomas mostraron una positividad progresiva de acuerdo con el grado de agresividad de la lesión (78,6%, 93,3% y 100%, respectivamente) (Tabla 8 y Figura 22).

Tabla 8. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y el tipo de patología.

Patología	p16				Total
	-	+	++	+++	
NIC I	11 (50%)	8 (36,36%)	3 (13,64%)	0	22 (100%)
NIC II	3 (21,4%)	2 (14,3%)	6 (42,9%)	3 (21,4%)	14 (100%)
NIC III-Carc. <i>in situ</i>	2 (6,5%)	3 (9,7%)	11 (35,5%)	15 (48,4%)	31 (100%)
Carc. condilomatoso	0	0	1 (100%)	0	1 (100%)
Carc. microinfiltrante	0	0	0	2 (100%)	2 (100%)
	16 (22,9%)	13 (18,6%)	21 (30%)	20 (28,5%)	70 (100%)

Figura 22. Representación esquemática de la relación entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y el tipo de patología



La tinción en los casos con de NIC III y carcinomas fue predominantemente mayor del 75% (+++), es decir, se observó en más de los 2/3 del espesor epitelial. Las

Figuras 23 y 24 muestran ejemplos representativos del patrón de inmunoexpresión de p16 en NIC.

Figura 23. Expresión de p16 en NIC I. Se observa positividad nucleocitoplasmática predominantemente en el 1/3 inferior del espesor epitelial (40x).

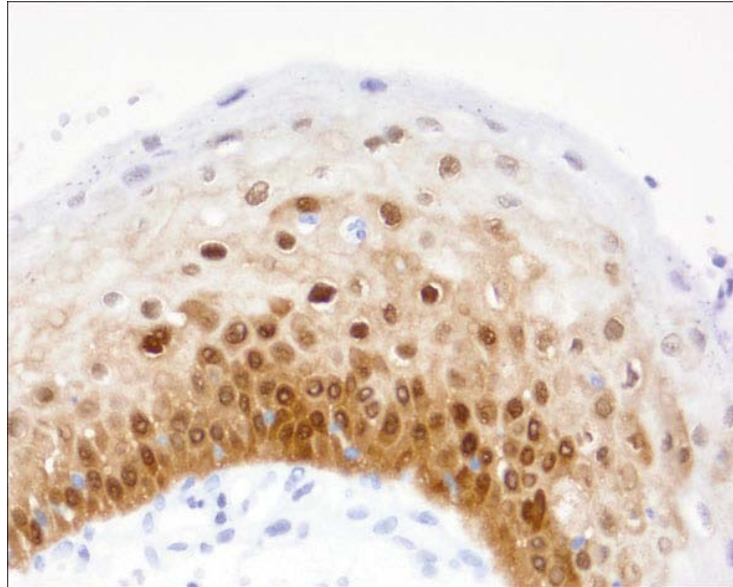
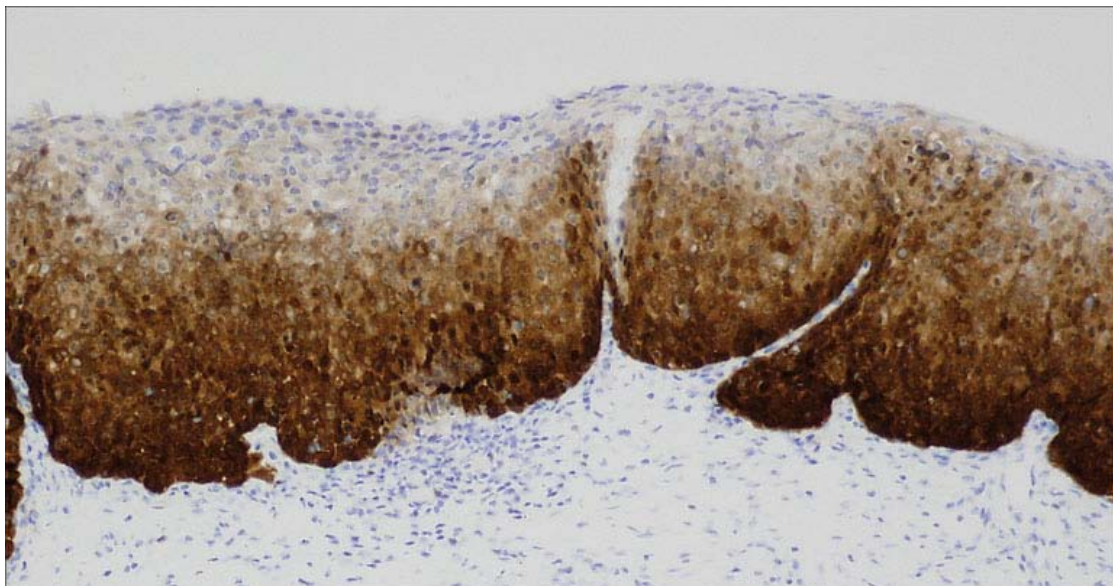


Figura 24. Expresión de p16 en NIC II (10x). Se observa inmunomarcaje en 2/3 del espesor epitelial.



4.3.-Expresión inmunohistoquímica de Ki67.

La mayoría de los casos de NIC I presentaron inmunotinción que se limitó predominantemente al 1/3 inferior del espesor epitelial, en los NIC II a los 2/3 y en los NIC III-Carcinoma *in situ* a todo el espesor (más del 75%). Por tanto, el porcentaje de inmunomarcaje con Ki67 fue aumentando progresivamente al avanzar el grado de la lesión (Tabla 9 y Figuras 25-27).

Tabla 9. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de Ki67 y el tipo de patología

Patología	Ki67				Total
	-	+	++	+++	
NIC I	0	17 (77,3%)	4 (18,2%)	1 (4,5%)	22 (100%)
NIC II	1 (7,1%)	5 (35,7%)	6 (42,9%)	2 (14,3%)	14 (100%)
NIC III-Carc. <i>in situ</i>	0	6 (19,4%)	8 (25,8%)	17 (54,8%)	31 (100%)
Carc. condilomatoso	0	0	0	1 (100%)	1 (100%)
Carc. microinfiltrante	0	0	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)
	1 (1,4%)	28 (40%)	19 (27,1%)	22 (31,4%)	70 (100%)

Figura 25. Representación esquemática de la relación entre la expresión inmunohistoquímica de Ki67 y el tipo de patología.

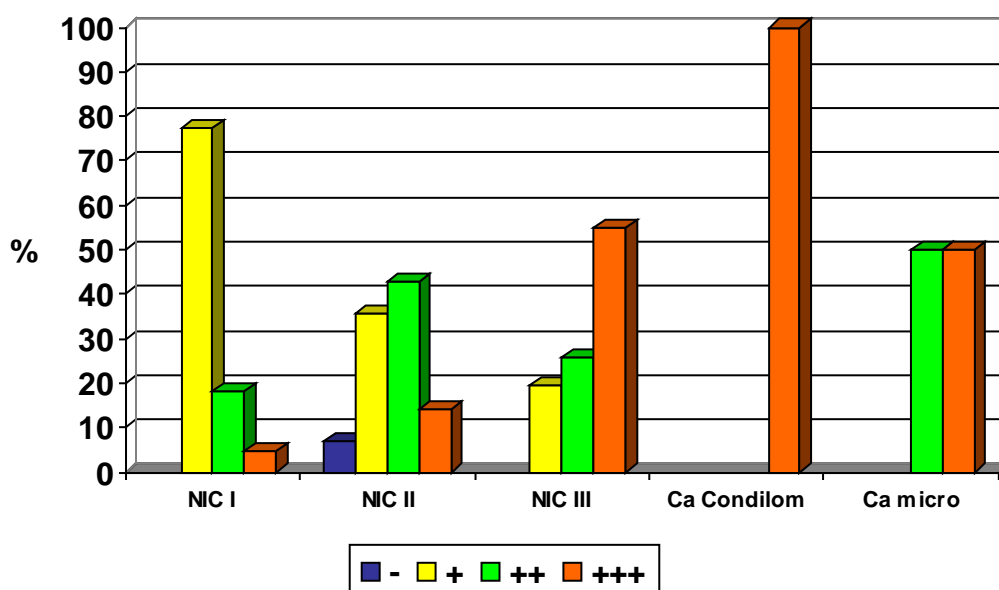


Figura 26. Expresión de Ki67 en NIC I. Se observa inmunorreactividad en el 1/3 inferior del epitelio (10x).

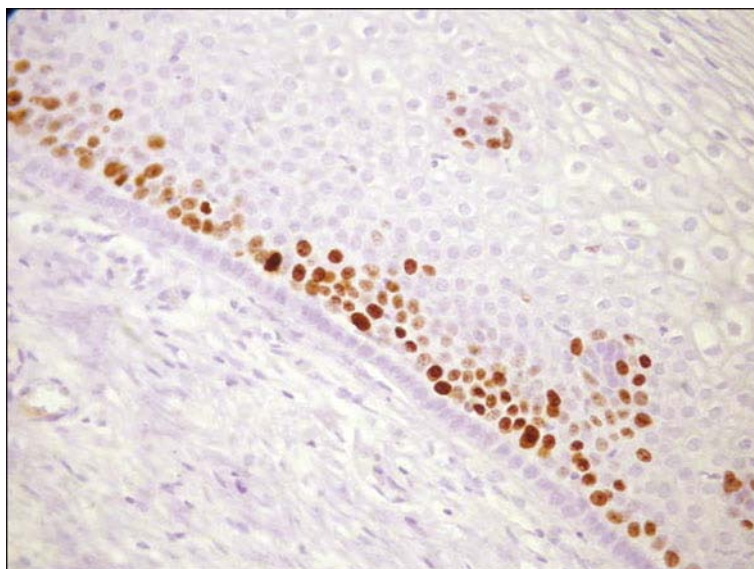
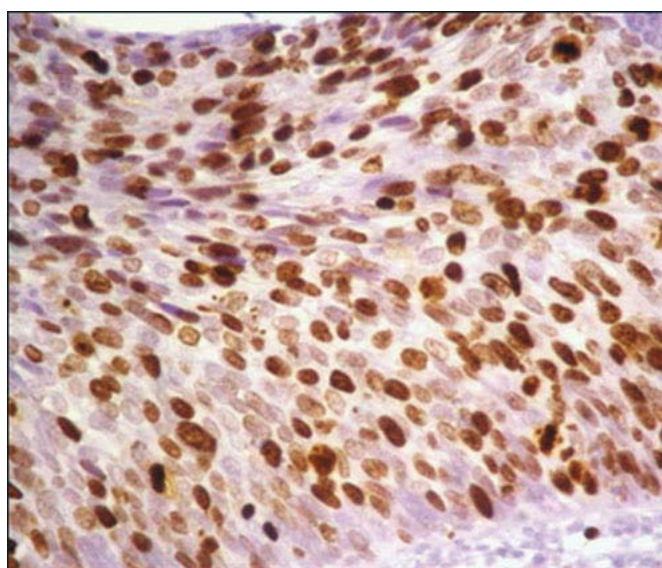


Figura 27. Expresión de Ki67 en NIC III-Carcinoma *in situ*. Se observa inmunotinción nuclear en todo el espesor del epitelio.



4.4.-Expresión inmunohistoquímica de p53.

La mayoría de los casos estudiados (65,7%) (n=46) resultaron negativos para la expresión de p53. Se observó inmunorreactividad frente a p53 en el 42,8% de los casos de NIC II y en el 35,5% de los casos de NIC III-Carcinoma *in situ*. En ambas lesiones, la expresión de p53 se observó predominantemente en el 1/3 inferior del espesor

epitelial. Uno de los dos casos de carcinoma microinfiltrantes también resultó negativo (Tabla 10, Figuras 28 y 29).

Tabla 10. Relación entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y el tipo de patología.

Patología	p53			Total
	-	+	++	
NIC I	16 (72,7%)	6 (27,3%)	0	22 (100%)
NIC II	8 (57,1%)	5 (35,7%)	1 (7,1%)	14 (100%)
NIC III-Carc. <i>in situ</i>	20 (64,5%)	6 (19,4%)	5 (16,1%)	31 (100%)
Carc. condilomatoso	1 (100%)	0	0	1 (100%)
Carc. microinfiltrante	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (100%)
	46 (65,7%)	18 (25,7%)	6 (8,6%)	70 (100%)

Figura 28. Representación esquemática de la relación entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y el tipo de patología.

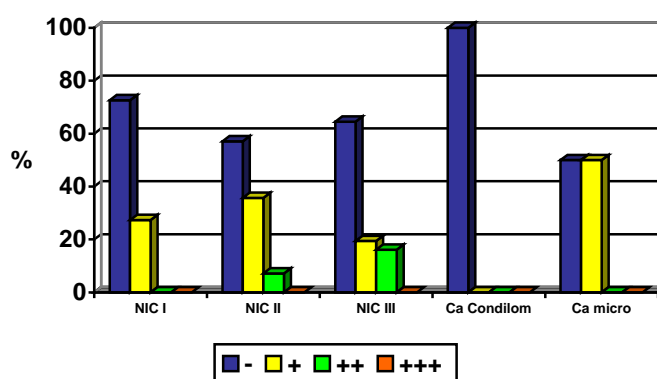
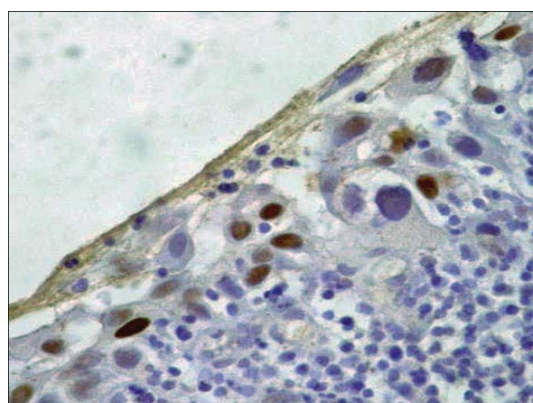


Figura 29. Inmunotinción con p53 en NIC III-Carcinoma *in situ* (40x). Se observa predominio de marcaje en las células del 1/3 inferior del epitelio.



4.5.-Relación entre la expresión de las proteínas p16 y Ki67.

Al analizar la relación entre la expresión de p16 y Ki67 se encontró una concordancia general de 75,7% (positividad para ambas proteínas) con un índice de concordancia kappa de 0,028 (bajo) ($p=0,584$), debido a que la mayoría los casos mostraron inmunorreactividad frente a Ki67 (98,6%) (Tabla 11).

Tabla 11. Relación entre la expresión del las proteínas p16 y Ki67.

		Ki67		
		Negativo	Positivo	Total
p16	Negativa	0	16 (22,9%)	16 (22,9%)
	Positiva	1 (1,4%)	53 (75,7%)	54 (77,1%)
Total		1 (1,4%)	69 (98,6%)	70 (100%)
$\chi^2_{\text{Pearson}} = 0,301$; $\kappa = 0,028$; $p = 0,584$				

4.6.-Relación entre la expresión de las proteínas p16 y p53

Al analizar los casos que presentaron expresión de estas proteínas se observó una concordancia general del 28,6% (ambos marcadores positivos) y del 17,1% cuando ambas proteínas fueron negativas, con un índice de concordancia kappa de 0,073 (bajo) ($p=0,373$) (Tabla 12).

Tabla 12. Relación entre la expresión del las proteínas p16 y p53.

		p53		
		Negativa	Positiva	Total
p16	Negativa	12 (17,1%)	4 (5,7%)	16 (22,9%)
	Positiva	34 (48,6%)	20 (28,6%)	54 (77,1%)
Total		46 (65,7%)	24 (34,3%)	70 (100%)
$\chi^2_{\text{Pearson}} = 0,794$; $\kappa = 0,073$; $p = 0,373$.				

4.7.-Relación entre la expresión de las proteínas p53 y Ki67.

Al estudiar la relación entre la expresión de p53 y Ki67 se encontró una concordancia general del 34,3% (positividad para ambos) y de 1,4% (ambas proteínas negativas), con un índice de concordancia kappa de 0,015 (bajo) ($p=0,584$) (Tabla 13).

Tabla 13. Relación entre la expresión del las proteínas p53 y Ki67.

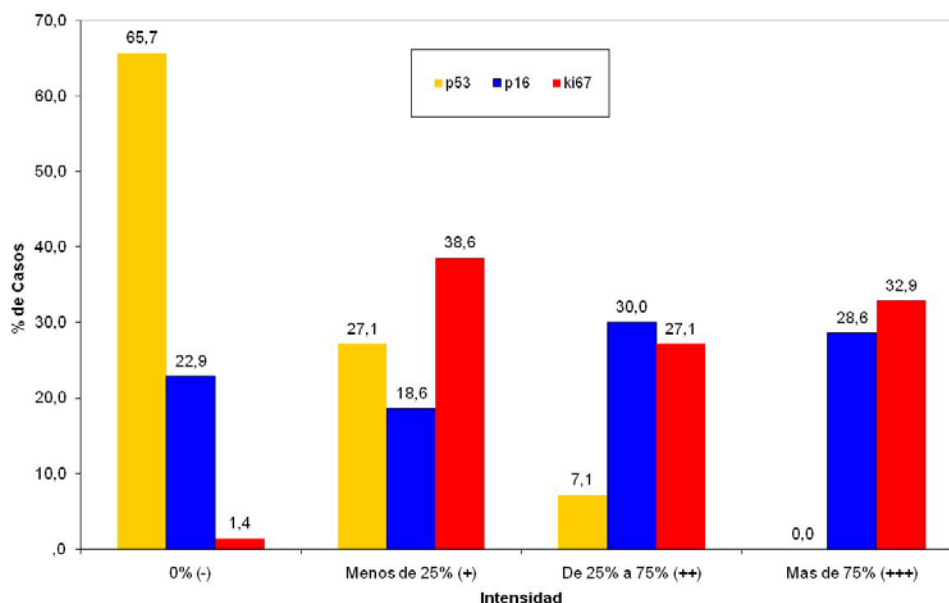
		p53		
		Negativo	Positivo	Total
Ki67	Negativo	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)
	Positivo	45 (64,3%)	24 (34,3%)	69 (98,6%)
Total		46 (65,7%)	24 (34,3%)	70 (100%)

$\chi^2_{\text{Pearson}}=0,529$; $k=0,015$; $p=0,467$.

En general, al analizar el patrón de inmunorreactividad de los casos estudiados frente a los anticuerpos p16, p53 y Ki67, independiente del grado o intensidad del marcaje, se observó que el mayor porcentaje expresión correspondió a Ki67 y p16 (98,6% y 77,1%, respectivamente), mientras que sólo el 34,3% de los casos resultaron positivos para p53. Por tanto, p16 y Ki67 exhiben un comportamiento similar ya que se expresan más a medida que progresa la neoplasia intraepitelial.

Al analizar el grado de afectación del espesor epitelial se observó que en el caso de p16 un 22,9% de lesiones no expresaron esta proteína mientras que los casos positivos se dividieron de manera similar entre los que el inmunomarcaje ocupaba 2/3 del espesor del epitelio (++) y aquellos en los que se observó expresión de la proteína en todo el espesor epitelial (+++). En el caso de Ki67, los casos se dividieron de forma similar [38,6% en el 1/3 basal del epitelio (+), 27,1% en 2/3 del epitelio (++) y 32,9% en la totalidad del espesor del epitelio]. La mayoría de los casos (65.7%) no expresaron p53, en el 27,1% se observó expresión en las células de la zona basal del epitelio (+) y el 7,1% de los casos presentaron marcaje en 2/3 del espesor epitelial (++) (Figura 30).

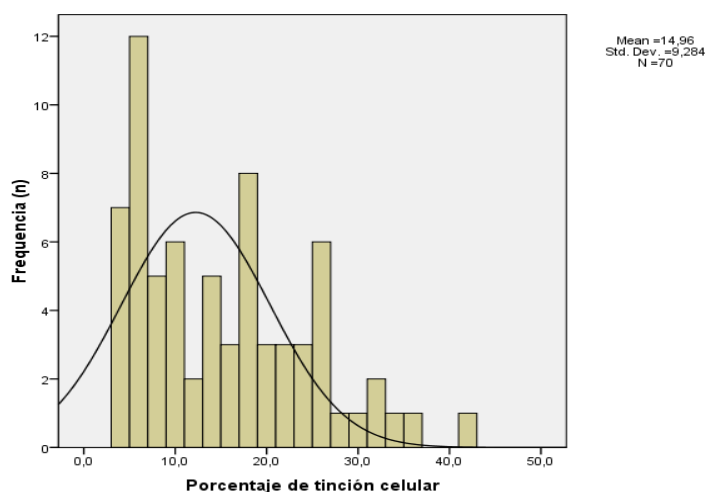
Figura 30. Extensión de la inmunoexpresión de p53, p16 y Ki67 en relación al espesor del epitelio.



4.8.-Expresión de Survivina.

En nuestra serie, la media de expresión de survivina en el conjunto de las lesiones estudiadas fue del 14%, con un valor máximo del 41% (Figura 31).

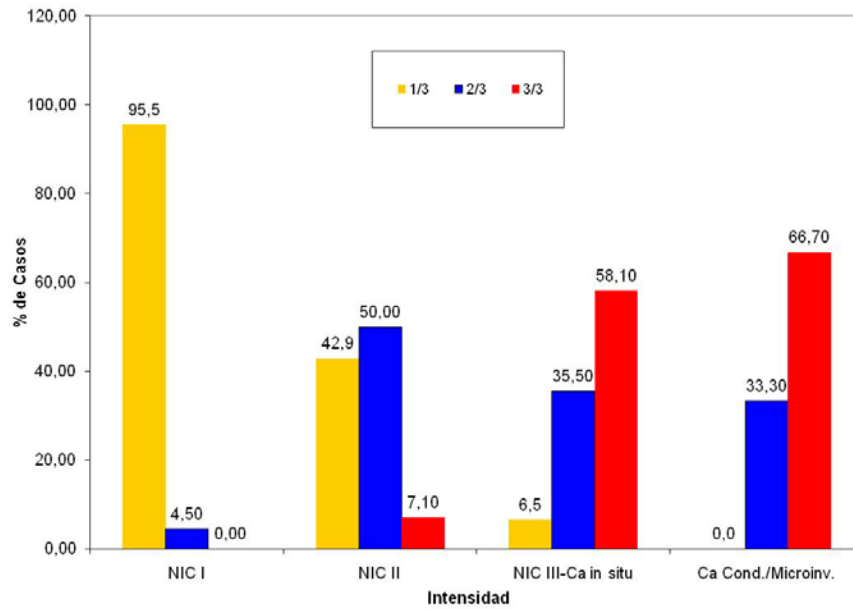
Figura 31. Representación esquemática del porcentaje de expresión de survivina



La expresión de survivina afectó a un mayor porcentaje del espesor epitelial a medida que aumentó el grado de lesión intraepitelial, de modo que en el caso de las NIC III-Carcinomas *in situ* y los carcinomas condilomatoso-microinvasores se observó

tinción en la totalidad del espesor epitelial en el 58,1% y 66,7% de las muestras, respectivamente ($\chi^2=51,662$; $p<0,001$) (Figuras 32-35).

Figura 32. Representación esquemática de la distribución de la serie según la expresión de survivina en relación al espesor epitelial.



$$\chi^2=51,662; p<0,001.$$

Figura 33. Expresión de survivina en NIC I. Se observa compromiso del 1/3 inferior del epitelio (10x).

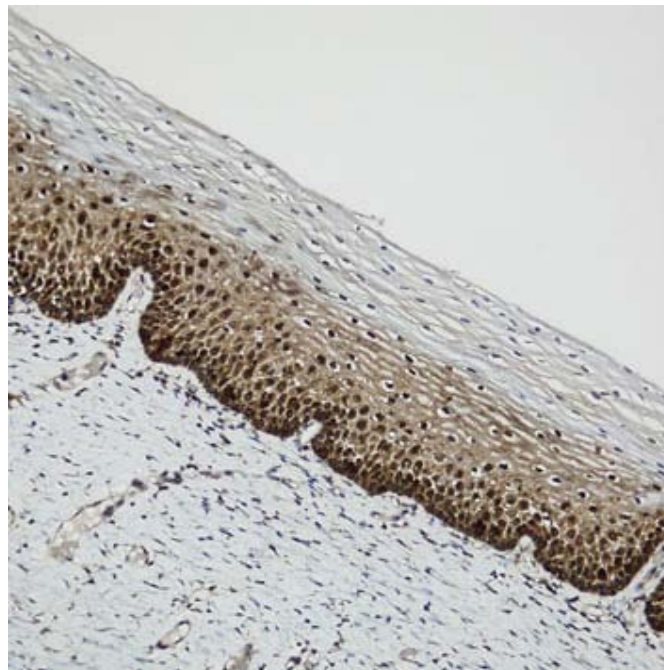


Figura 34. Expresión de survivina en NIC II. Se observa compromiso de 1/3 a 2/3 del espesor epitelial (10x).

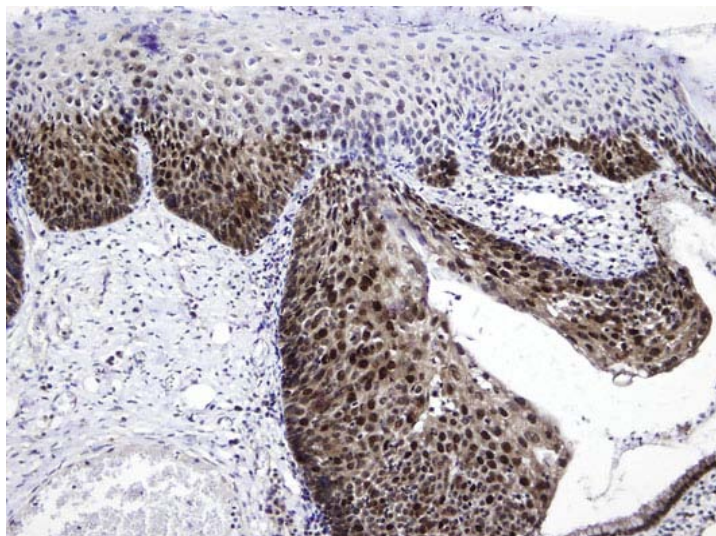
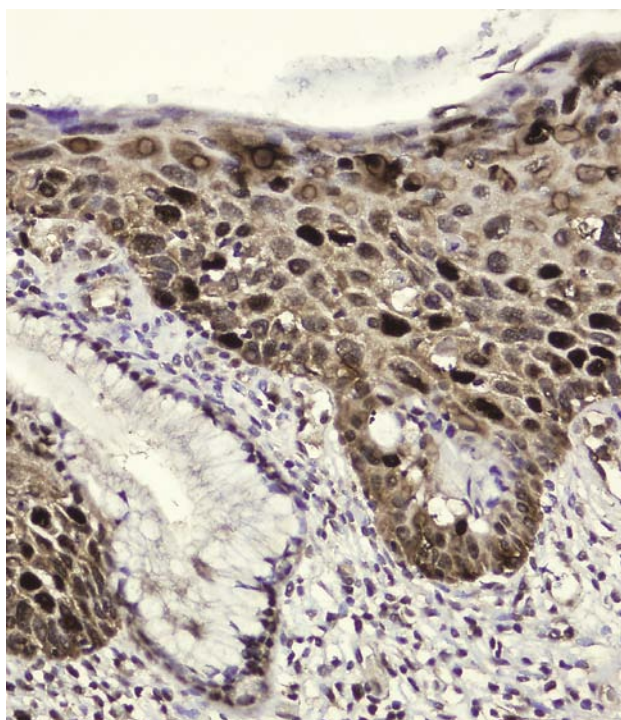


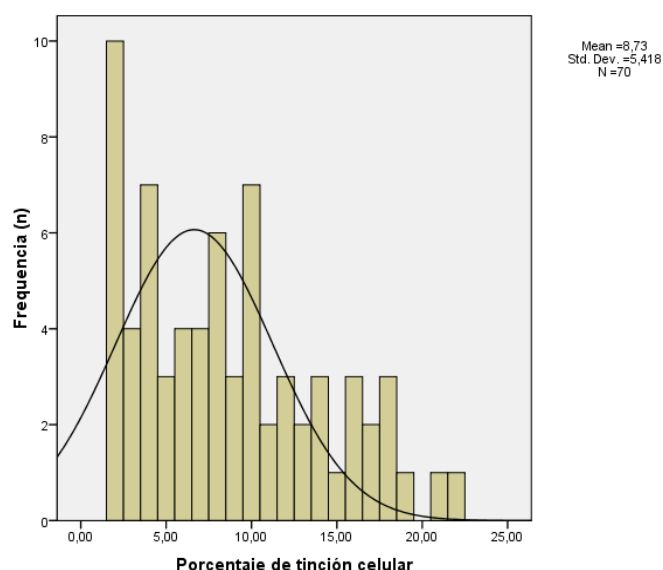
Figura 35. Expresión nuclear de survivina en NIC III. Se observa afectación de la totalidad del espesor epitelial (40x).



4.9.-Expresión de Aurora A.

En un 54,3% de los casos la expresión de Aurora A en las células de las lesiones estudiadas fue del 8% o menos, obteniéndose como valor máximo de inmunomarcaje un 22% (Figura 36). Respecto a la intensidad de la expresión de Aurora A, esta fue débil en el 55,7%, moderada en el 17,1% y fuerte en el 27,1% de los casos.

Figura 36. Representación esquemática del porcentaje de expresión de Aurora A.

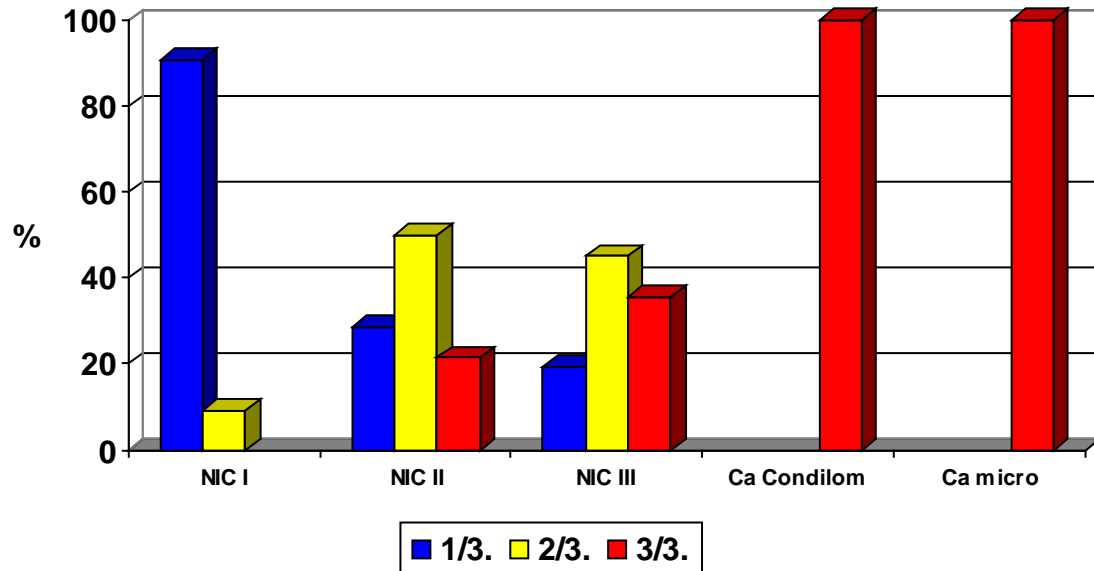


Se observó marcado predominio de la expresión de Aurora A en el 1/3 inferior del epitelio en los casos de NIC I (90,9%); en las NIC II predominó el inmunomarcaje en los 2/3 del espesor epitelial mientras que en las NIC III la expresión de Aurora A se observó tanto en los 2/3 como en todo el espesor del epitelio aunque con ligero predominio de los 2/3 (45,2% y 35,5%, respectivamente). Los casos de carcinoma mostraron compromiso de la totalidad del espesor epitelial (Tabla 14, Figura 37).

Tabla 14. Distribución de la muestra según la expresión de Aurora A en relación al espesor del epitelio.

	Espesor epitelial			Total
	1/3	2/3	3/3	
NIC I	20 (90,9%)	2 (9,1%)	0	22 (100%)
NIC II	4 (28,6%)	7 (50%)	3 (21,4%)	14 (100%)
NIC III – Carcinoma <i>in situ</i>	6 (19,4%)	14 (45,2%)	11 (35,5%)	31 (100%)
Carc. condilomatoso	0	0	1 (100%)	1 (100%)
Carc. microinfiltrante	0	0	2 (100%)	2 (100%)
	30 (42,9%)	23 (32,9%)	17 (24,3%)	70 (100%)

Figura 37. Representación esquemática de la distribución de la serie según la expresión de Aurora A en relación al espesor del epitelio.



Las Figuras 38 y 39 muestran ejemplos ilustrativos de la expresión de Aurora A en la serie estudiada.

Figura 38. Expresión de Aurora A en NIC III-Carcinoma *in situ*. Obsérvese el intenso inmunomarcaje de las mitosis en el espesor del epitelio (40x).

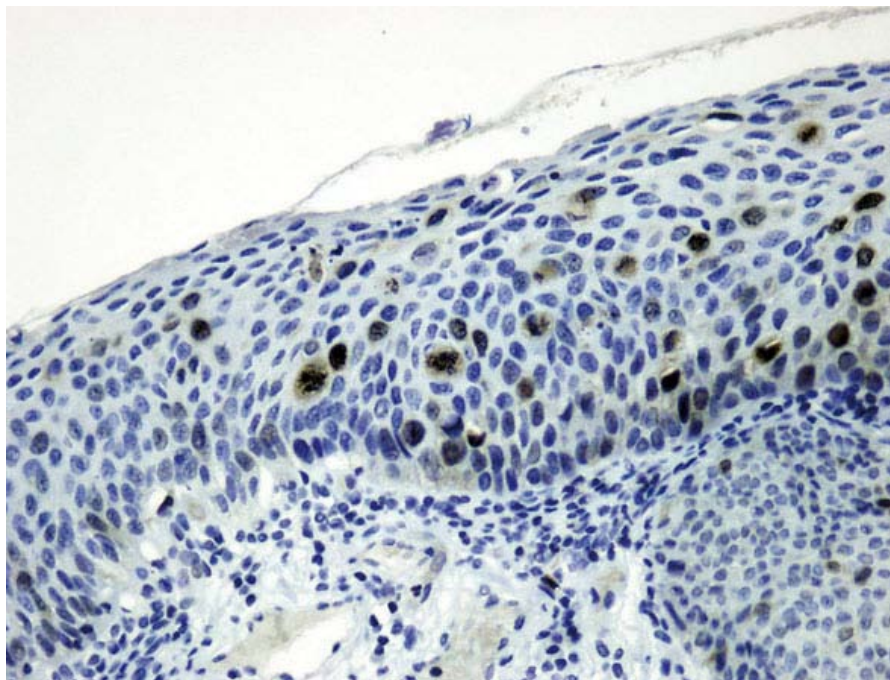
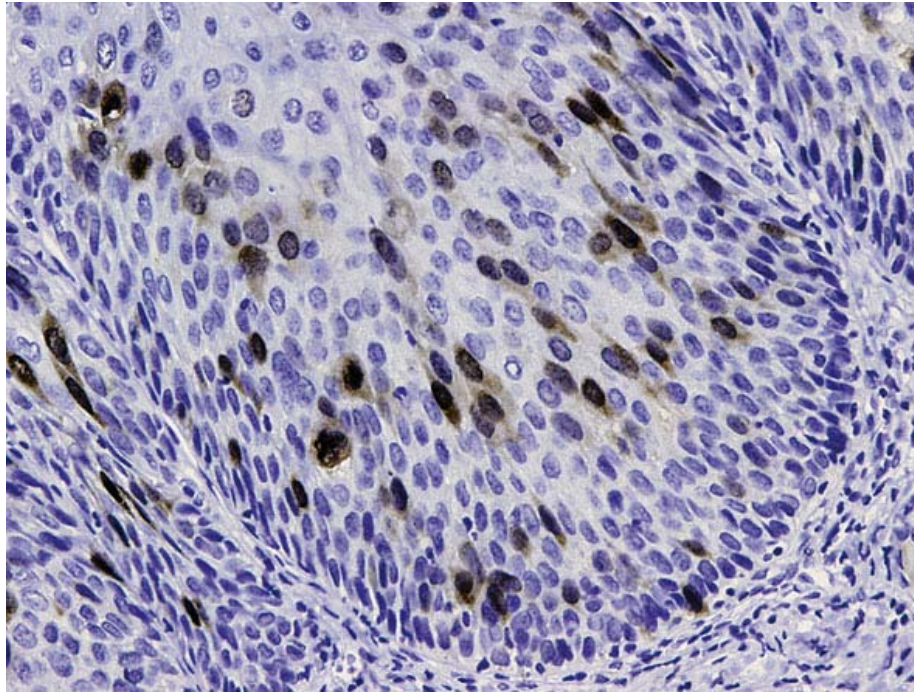


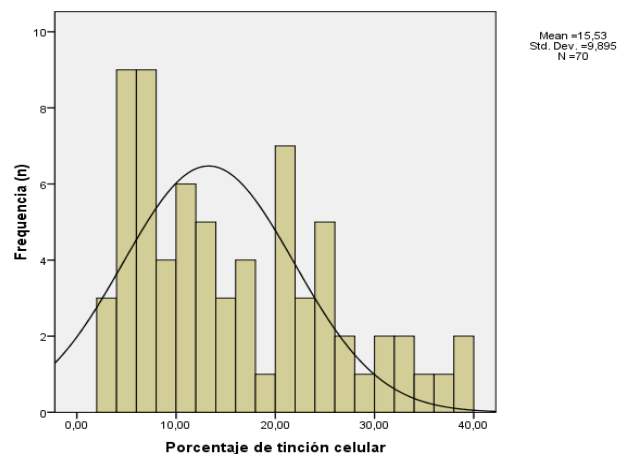
Figura 39. Expresión de Aurora A en NIC III-Carcinoma *in situ*. Se observan células con inmunomarcaje en los 2/3 del espesor del epitelio (40x).



4.10.-Expresión de Aurora B.

En relación al número de células que expresaron Aurora B en la serie, se observó que en la mitad de los casos (50%) el porcentaje de células con inmunomarcaje de la proteína fue del 12%, con un valor máximo del 39% (Figura 40).

Figura 40. Representación esquemática del porcentaje de expresión de Aurora B.



En los casos de NIC I y NIC II el patrón de expresión se mantuvo en el 1/3 inferior del epitelio; en cambio, en las NIC III el patrón de inmunoexpresión se observó

entre los 2/3 y todo el espesor epitelial, en una misma proporción. El caso de carcinoma condilomatoso mostró compromiso de los 2/3 del espesor epitelial. Los dos carcinomas microinfiltrantes también presentaron un patrón dual entre 2/3 y todo el espesor del epitelio (Figuras 41-44).

Figura 41. Representación esquemática de la distribución de la serie según la expresión de Aurora B en relación al espesor del epitelio.

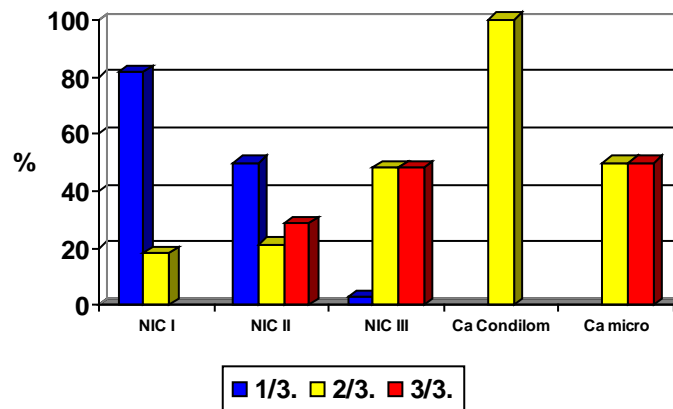


Figura 42. Expresión nuclear de Aurora B en una zona de NIC I. Se observa compromiso del 1/3 inferior del epitelio (20x).

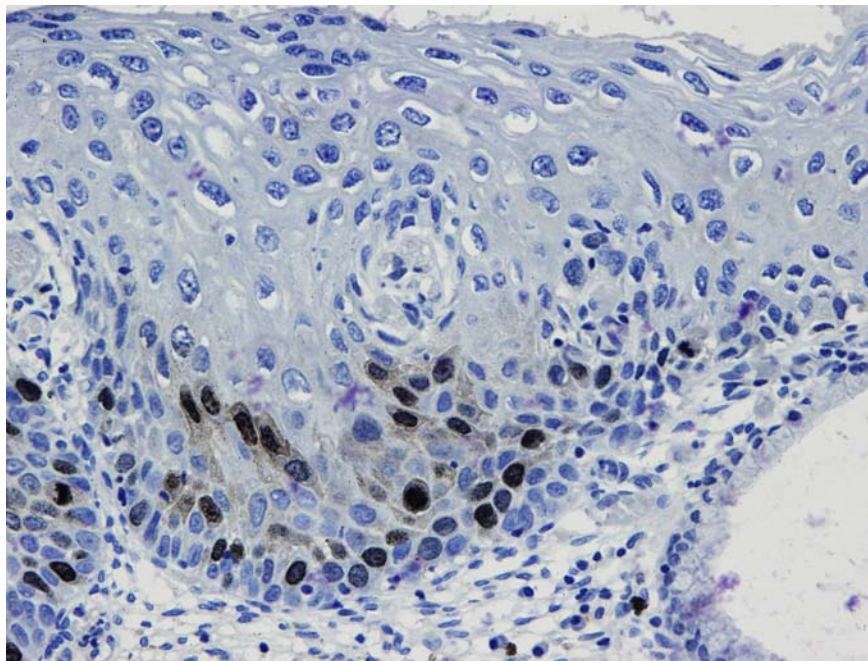


Figura 43. Expresión nuclear de Aurora B en una zona de NIC II. Se observa compromiso de los 2/3 inferiores del espesor epitelial (20x).

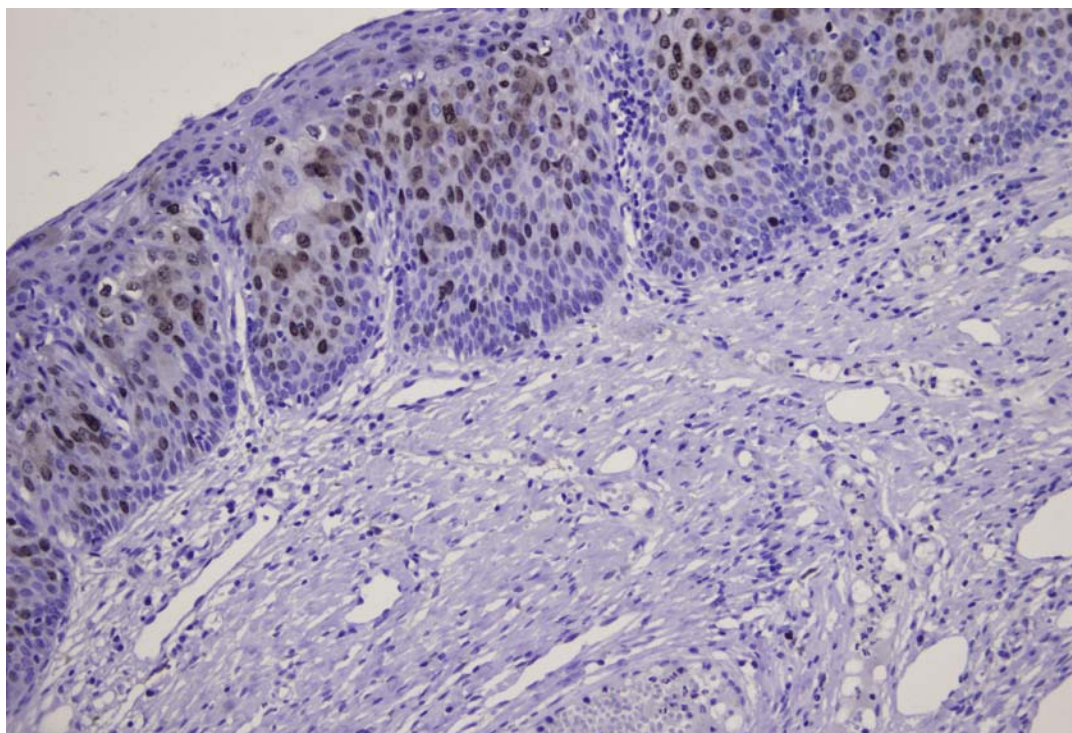
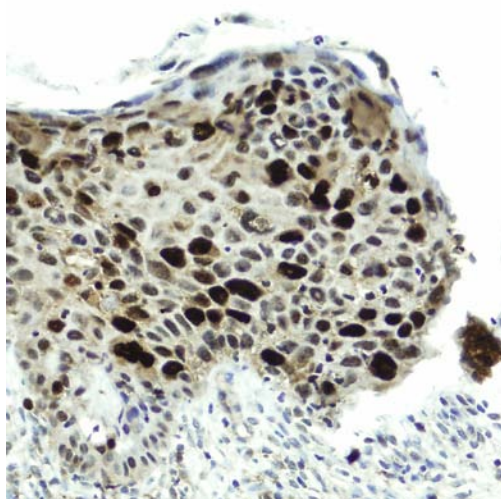


Figura 44. Expresión nuclear de Aurora B en una zona de NIC III. Se observa compromiso de la totalidad del espesor epitelial (40x).



4.11.-Correlación entre la expresión de survivina, Aurora B y Aurora A.

La expresión de survivina, Aurora A y Aurora B aumentó progresivamente a medida que progresó el grado de lesión. El porcentaje de células marcadas fue significativamente mayor en aquellas patologías de mayor gravedad (NIC III-

Carcinoma *in situ* y los carcinomas condilomatosos-microinfiltrantes), tanto para survivina (ANOVA $\sum x^2_{\text{entregupos}}=2752,98$, $F=18,963$, $p<0,001$), como para Aurora B (ANOVA $\sum x^2_{\text{entregupos}}=2805,49$, $F=15,626$, $p<0,001$) y Aurora A (ANOVA $\sum x^2_{\text{entregupos}}=742,447$, $F=12,727$, $p<0,001$). De todas estas proteínas, la Aurora A fue la que mostró menor expresión en las lesiones estudiadas (Figuras 45-48).

Figura 45. Media, desviación típica, mínimo y máximo valor de los casos según la expresión de survivina.

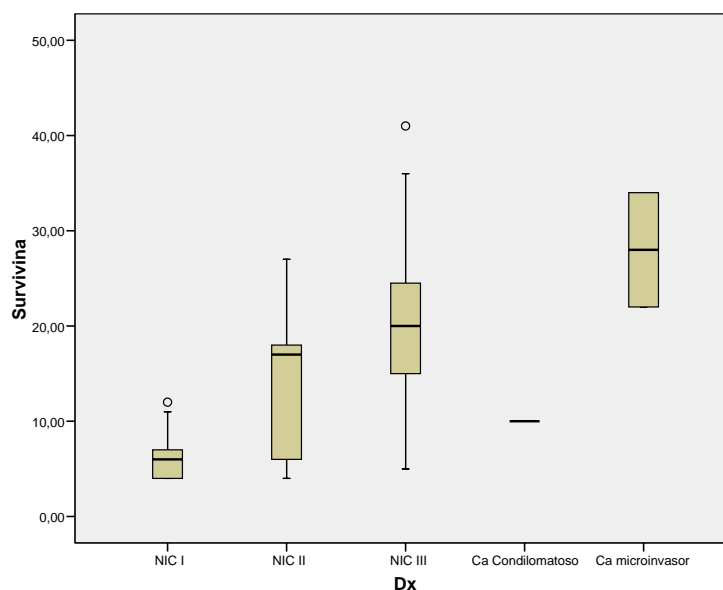


Figura 46. Media, desviación típica, mínimo y máximo valor de los casos según la expresión de Aurora B.

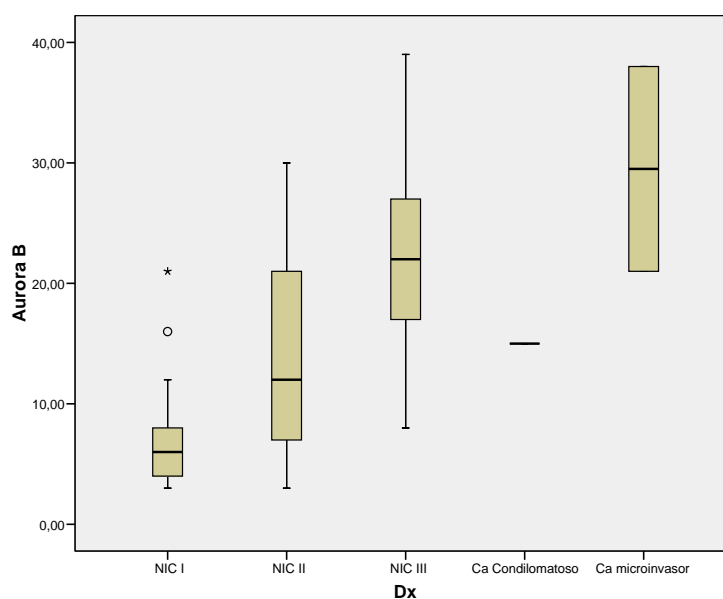


Figura 47. Media, desviación típica, mínimo y máximo valor de los casos según la expresión de Aurora A.

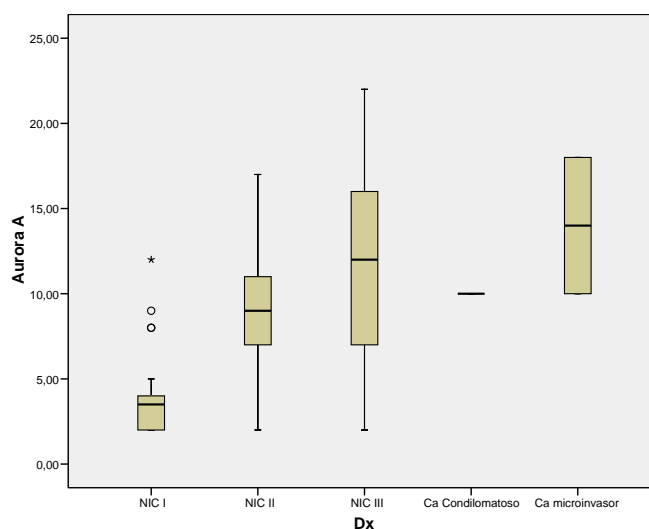
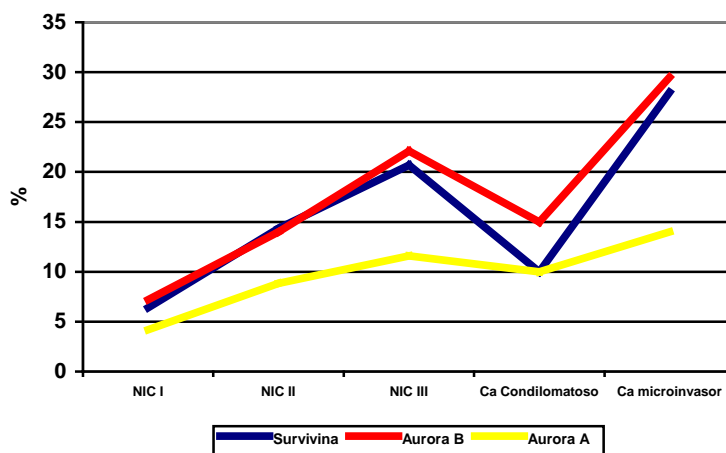


Figura 48. Porcentaje medio de expresión de survivina, Aurora A y Aurora B en la serie estudiada.



4.12.-Relación entre la expresión de p16 y survivina.

Se observó una correlación significativa entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y survivina en los casos de neoplasias intraepiteliales cervicales, carcinoma condilomatoso y carcinomas microinfiltrantes, especialmente en aquellos casos en los que la expresión de estas proteínas superaba el tercio inferior del epitelio. Así, ambos marcadores se correlacionan más cuando existe un compromiso de los 2/3 y del total del espesor epitelial: a medida que la proteína p16 se expresa en mayor porcentaje la

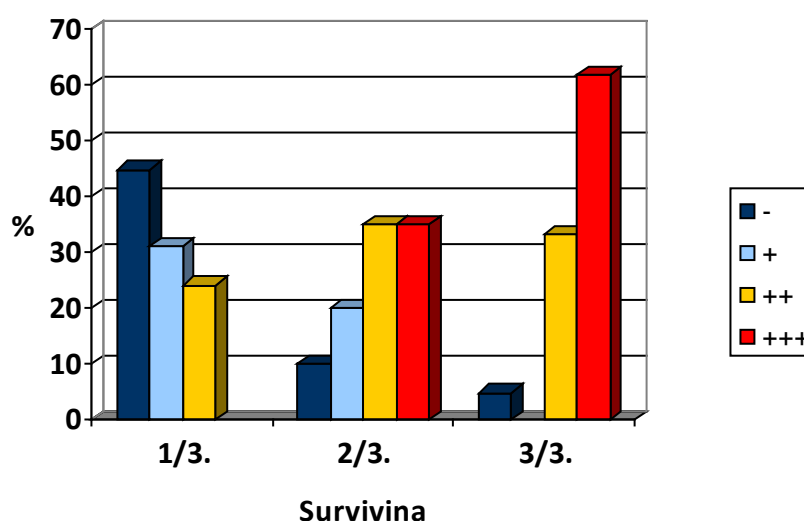
expresión de survivina se observa en una mayor proporción del espesor epitelial (Tabla 15 y Figura 49).

Tabla 15. Relación entre la expresión de p16 y survivina.

p16	Survivina							
	1/3		2/3		3/3		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	13	44.8	2	10	1	4.8	16	22,9
+	9	31	4	20	0	0	13	18,6
++	7	24,1	7	35	7	33,3	21	30
+++	0	0	7	35	13	61,9	20	28,6
TOTAL	29	100	20	100	21	100	70	100

Coeficiente de correlación de Spearman = 0,66; p = 0,00001

Figura 49. Representación esquemática entre la expresión de p16 y survivina.



4.13.-Relación entre la expresión de p16, Aurora A y Aurora B.

También se observó una relación significativa entre la expresión de p16 y la de las Aurora quinasas A y B (p = 0,00001). A medida que un mayor porcentaje de células presentaron expresión de p16 se observó un mayor compromiso de marcaje del espesor epitelial con las Auroras quinasas A y B (Tablas 16 y 17; Figuras 50 y 51).

Tabla 16. Relación entre la expresión de p16 y Aurora B.

p16	Aurora B							
	1/3		2/3		3/3		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	13	50	2	8,3	1	5	16	22,9
+	7	26,9	4	16,7	2	10	13	18,6
++	5	19,2	9	37,5	7	35	21	30
+++	1	3,8	9	37,5	10	50	20	28,6
TOTAL	26	100	24	100	20	100	70	100

Coefficiente de correlación de Spearman = 0,58; p = 0,00001

Figura 50. Representación esquemática entre la expresión de p16 y Aurora B.

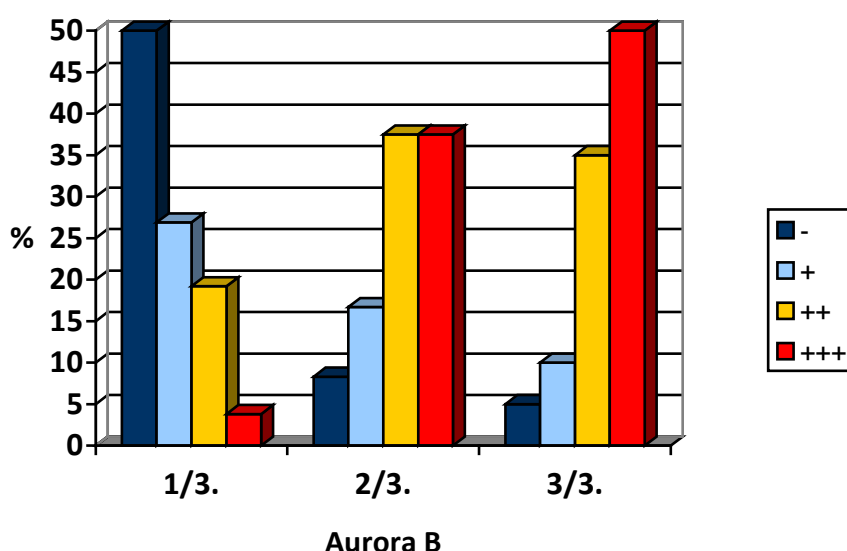
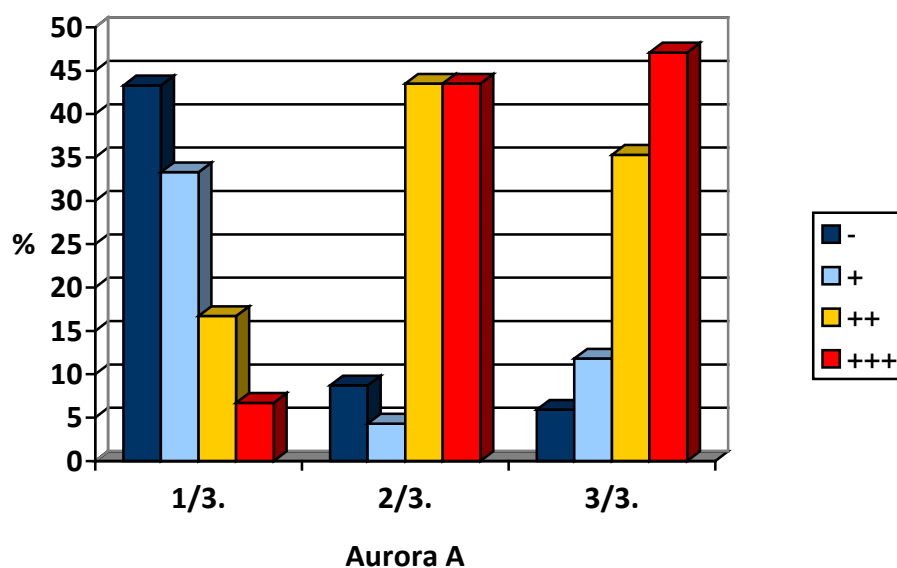


Tabla 17. Relación entre la expresión de p16 y Aurora A.

p16	Aurora A							
	1/3		2/3		3/3		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	13	43,3	2	8,7	1	5,9	16	22,9
+	10	33,3	1	4,3	2	11,8	13	18,6
++	5	16,7	10	43,5	6	35,3	21	30
+++	2	6,7	10	43,5	8	47,1	20	28,5
TOTAL	30	100	23	100	17	100	70	100

Coefficiente de correlación de Spearman = 0,59; p = 0,00001

Figura 51. Representación esquemática entre la expresión de p16 y Aurora A.



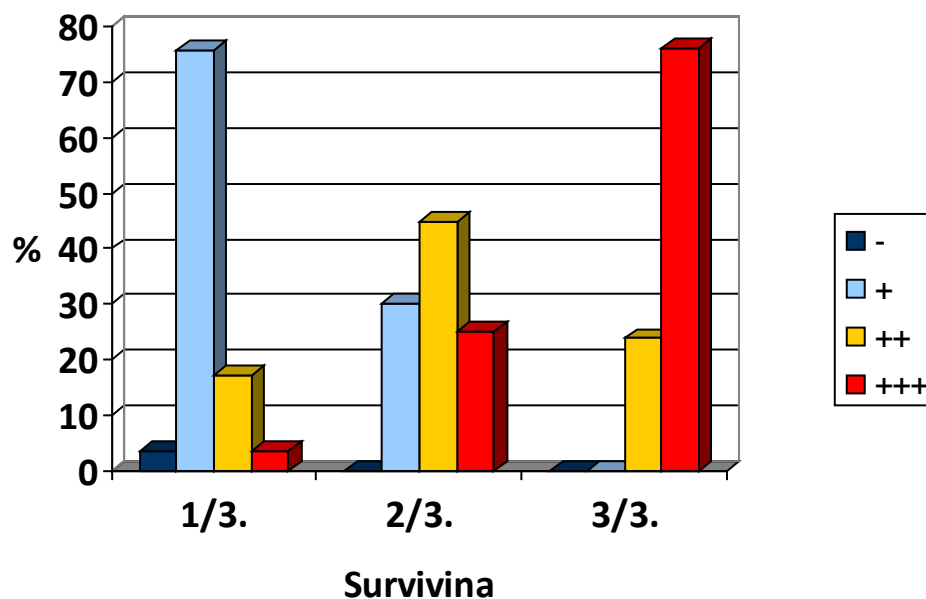
4.14.-Relación entre la expresión de Ki67 y survivina.

El porcentaje de células con expresión de Ki67 se correlacionó con el patrón de expresión de survivina en el espesor del epitelio cervical (Tabla 18 y Figura 52).

Tabla 18. Relación entre la expresión de Ki67 y survivina.

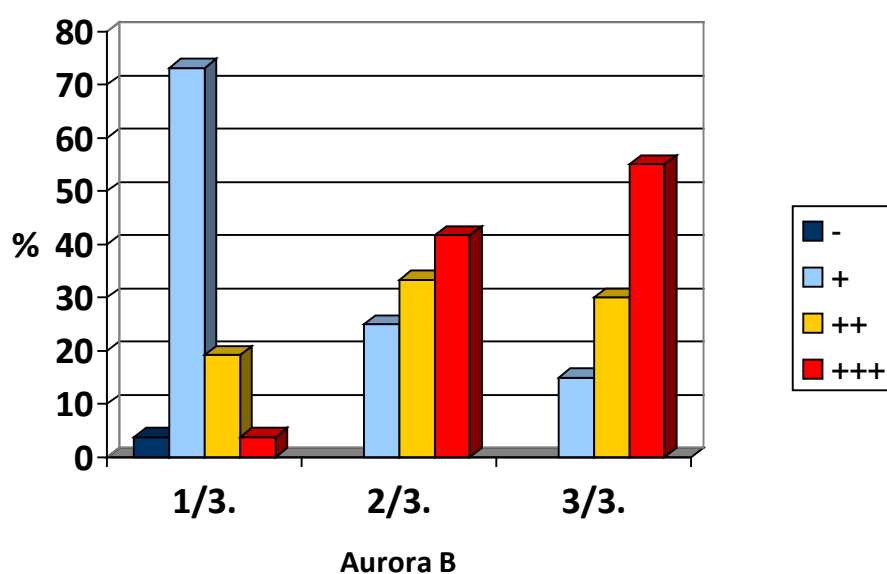
Ki67	Survivina							
	1/3		2/3		3/3		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	1	3,4	0	0	0	0	1	1.4
+	22	75,9	6	30	0	0	28	40
++	5	17,2	9	45	5	23,8	19	27,1
+++	1	3,4	5	25	16	76,2	22	31,4
TOTAL	29	100	20	100	21	100	70	100

Coefficiente de correlación de Spearman = 0,7; p = 0,00001

Figura 52. Representación esquemática entre la expresión de Ki67 y survivina.

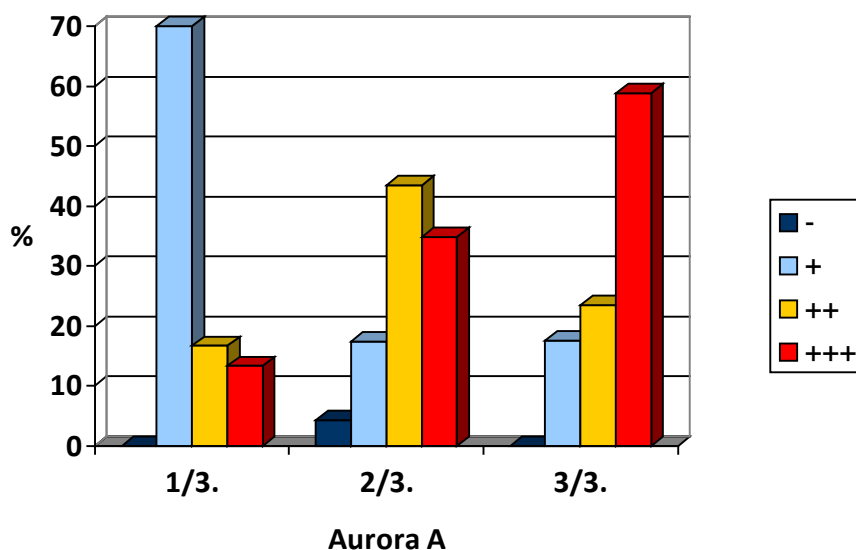
4.15.-Relación entre la expresión de Ki67, Aurora A y Aurora B.

Se observó correlación entre el porcentaje de células marcadas con Ki67 y el patrón de expresión a nivel del espesor epitelial de las Aurora quinasas B y A (Figuras 53 y 54).

Figura 53. Representación esquemática entre la expresión de Ki67 y Aurora B.

Coefficiente de correlación de Spearman = 0,56; p = 0,00001

Figura 54. Representación esquemática entre la expresión de Ki67 y Aurora A.



Coeficiente de correlación de Spearman = 0,47; p = 0,00001

4.16.-Relación entre la expresión de p53 y survivina.

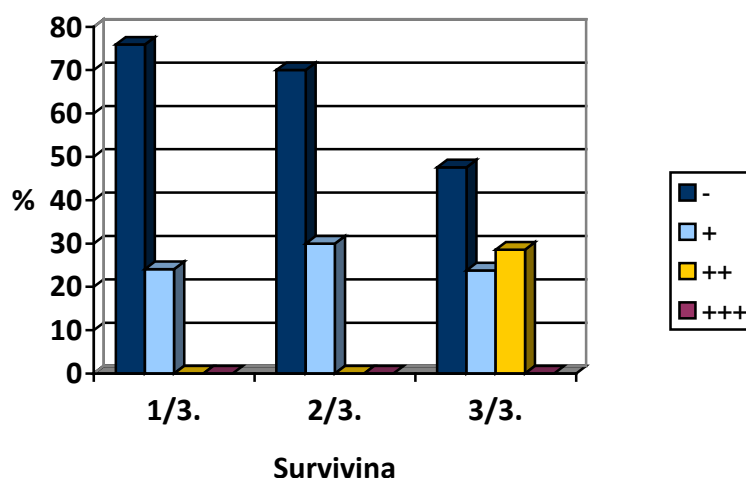
No se observó correlación significativa entre la expresión de esta proteínas. La expresión de p53 fue predominantemente negativa y cuando mostró positividad en algunas células ésta no se correspondió con el patrón de tinción a nivel del espesor epitelial de la survivina (Tabla 19, Figura 55).

Tabla 19. Relación entre la expresión de p53 y survivina.

p53	Survivina							
	1/3		2/3		3/3		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	22	75,9	14	70	10	47,6	46	65,7
+	7	24,1	6	30	5	23,8	18	25,7
++	0	0	0	0	6	28,6	6	8,6
+++	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	29	100	20	100	21	100	70	100

Coeficiente de correlación de Spearman: 0,26; p = 0,2

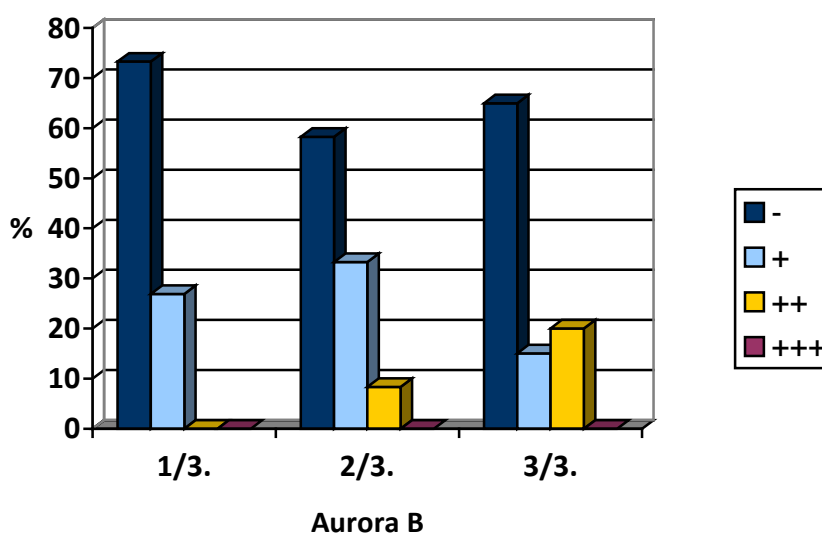
Figura 55. Representación esquemática entre la expresión de p53 y survivina.



4.17.-Relación entre la expresión de p53 y Aurora quinasas A y B.

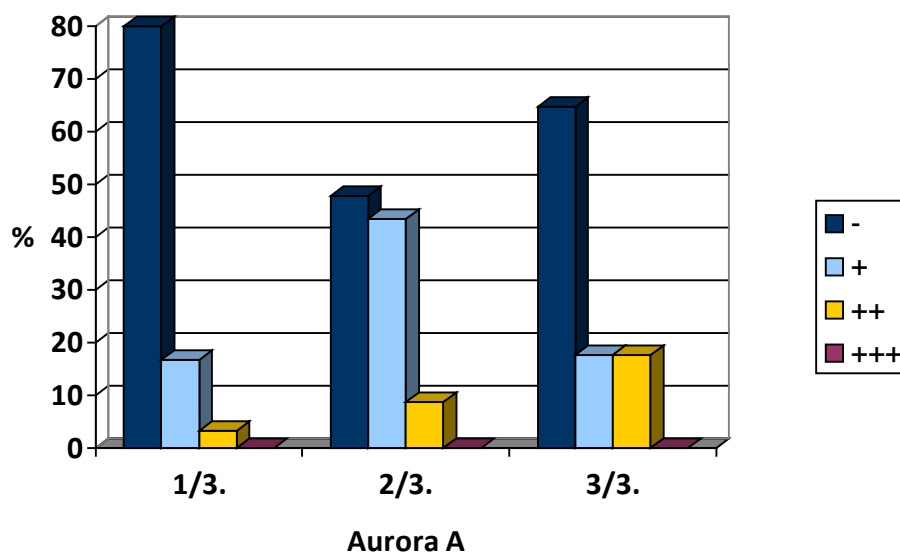
La relación entre el porcentaje de células marcadas con p53 y el patrón de expresión de las Auroras quinasas A y B a nivel del espesor epitelial fue muy bajo (coeficiente de correlación de Spearman de 0,09 y 0,17; respectivamente). A medida que la expresión de las Aurora quinasas B y A aumentaba en el espesor del epitelio cervical se observó que el marcaje celular con p53 fue variable, predominando la no expresión o la expresión en un porcentaje bajo de células (Figuras 56 y 57).

Figura 56. Representación esquemática entre la expresión de p53 y Aurora B.



Coeficiente de correlación de Spearman = 0,09; p = 0,41

Figura 57. Representación esquemática entre la expresión de p53 y Aurora A.



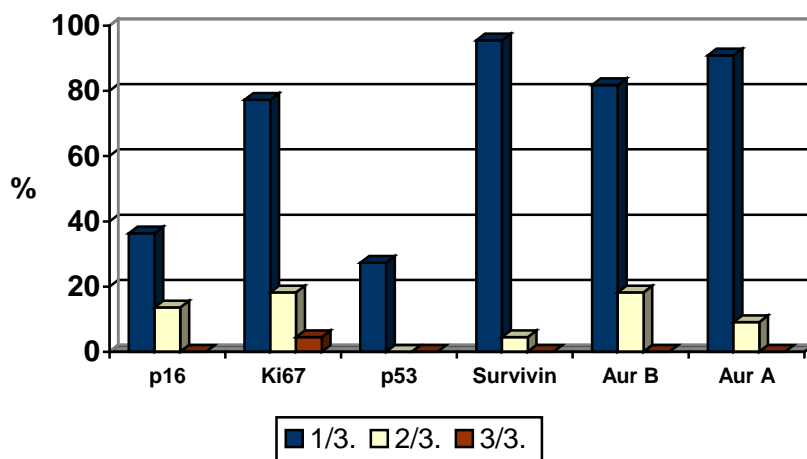
Coeficiente de correlación de Spearman = 0,17; p = 0,14

4.18.-Comparación de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores utilizados y tipo de lesión.

4.18.1.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos analizados en la NIC I.

En los casos de NIC I todos los marcadores utilizados exhibieron predominio de tinción en el 1/3 inferior del espesor epitelial, observando mayor porcentaje expresión con la survivina, Aurora A y Aurora B (Figura 58).

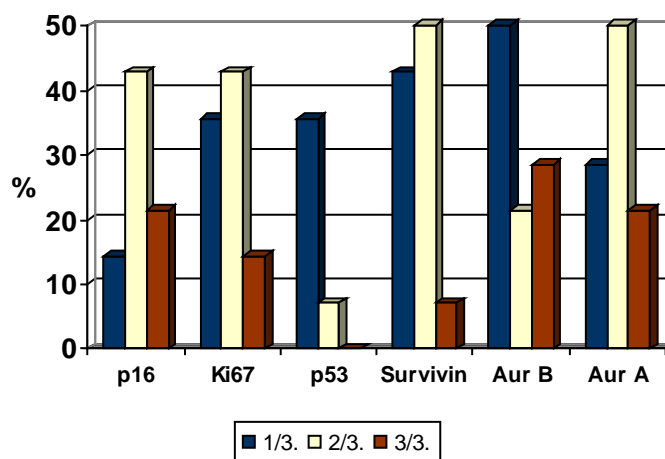
Figura 58. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en las NIC I.



4.18.2.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos utilizados en la NIC II.

En los casos de NIC II el inmunomarcaje predominó en los 2/3 del espesor epitelial con un comportamiento similar entre los anticuerpos analizados, con la excepción de p53 y Aurora B, que mostraron una tendencia a la tinción basal (1/3 inferior del epitelio) (Figura 59).

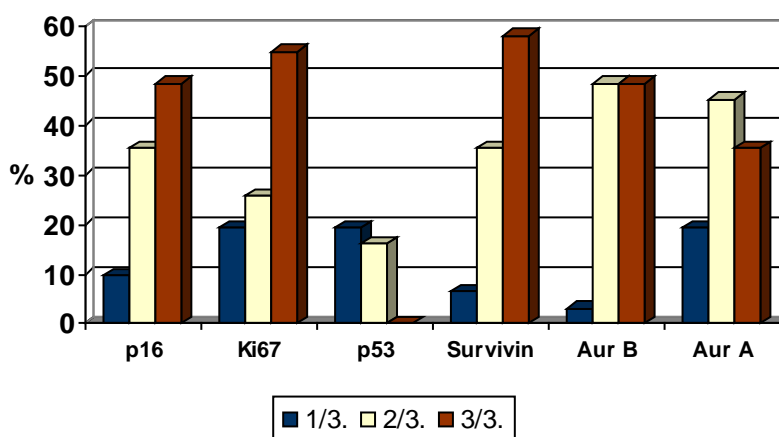
Figura 59. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en las NIC II.



4.18.3.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos utilizados en NIC III- Carcinoma *in situ*.

En los NIC III-Carcinoma *in situ* el inmunomarcaje con los anticuerpos estudiados se extendió mayoritariamente a todo el espesor epitelial, especialmente en el caso de Ki67 y survivina. La proteína p53 mostró un nivel de expresión relativamente bajo ya que en ningún caso se observó tinción en todo el espesor epitelial (Figura 60).

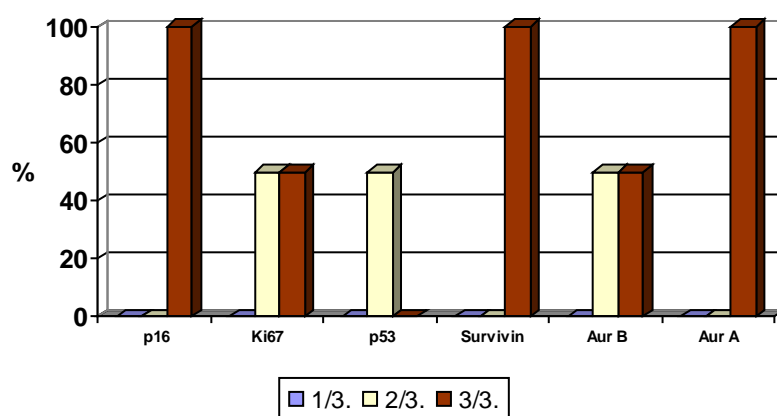
Figura 60. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en las NIC III.



4.18.4.-Expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos utilizados en los carcinomas microinfiltrantes.

Aunque únicamente se analizaron dos muestras de este tipo de lesión y, por tanto, los resultados obtenidos no pueden considerarse significativos, se observó que la expresión de p16, survivina y Aurora A fue similar, con afectación de la totalidad del espesor epitelial (Figura 61).

Figura 61. Distribución de la expresión de los anticuerpos empleados en los carcinomas microinfiltrantes.



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

El presente trabajo de investigación se realizó para analizar la expresión inmunohistoquímica de una serie de proteínas involucradas en los mecanismos de regulación del ciclo celular (p16, p53, Aurora quinasas A y B, survivina y Ki67), en 67 neoplasias intraepiteliales cervicales, 1 carcinoma condilomatoso y 2 carcinomas microinfiltrantes del cérvix uterino. Las muestras se obtuvieron del archivo de la Sección de Patología Ginecológica del Instituto Anatomopatológico “Dr José A. O’Daly” de la Universidad Central de Venezuela.

Hoy en día se acepta que el carcinoma de cuello uterino representa el segundo cáncer más común en la mujer a nivel mundial y es la primera causa de mortalidad femenina en los países en vías de desarrollo. De igual manera, la estrecha relación existente entre el VPH y el cáncer de cuello uterino está bien establecida basada tanto en las evidencias epidemiológicas como en el resultado de las investigaciones sobre la carcinogénesis cervical, que indican que dicho proceso se inicia con una infección persistente por ciertos tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, independientemente de la existencia de otros factores de riesgo. Así, los carcinomas de cérvix uterino y las neoplasias intraepiteliales se asocian con la infección por VPH. Resultados semejantes obtuvimos en nuestra serie donde se observaron signos morfológicos de la infección por VPH en un 94,3 % de los casos.

Se ha demostrado que el evento desencadenante de la transformación neoplásica es la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped, que resulta en la disrupción de la región E2 del virus produciendo sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7. A continuación, esas proteínas interfieren con dos situaciones claves del ciclo celular; la vía de p53 y la de pRb, respectivamente. En condiciones normales, la vía de p53 produce detención del crecimiento celular o apoptosis en situaciones de daño genómico mientras que pRb regula la progresión de las fases iniciales del ciclo celular. Las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo inducen la inactivación de esas vías resultando en proliferación celular descontrolada, inestabilidad genética, alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas e inmortalización.¹⁶ La detección de estas alteraciones contribuye a un mejor conocimiento de la biología de la neoplasia cervical.

5.1. Expresión de p16.

La proteína p16, producto del gen supresor tumoral *CDKN2A* (*MTS1*, *INK4A*), es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que frena el ciclo al inactivar el complejo ciclina D/cdk4-6, que tiene como función principal fosforilar a la proteína supresora tumoral Rb. Cuando pRB está hipofosforilada se mantiene unida al factor de proliferación E2F, impidiendo de esta forma que el ciclo celular progrese desde la fase G1 a la fase S. Esta proteína puede verse inactivada funcionalmente cuando la lesión neoplásica se encuentra asociada a VPH de alto riesgo que se ensambla a ella y la bloquea mediante la expresión específica del oncogén viral E7. El efecto final de este bloqueo es una proliferación celular prolongada y descontrolada que es la base del desarrollo de una lesión neoplásica.

Existe una relación inversa entre la expresión de p16 y la presencia de pRb normal. La proteína p16 se detecta cuando pRb esta mutada, delecionada o inactivada y se reduce o está ausente en células que contienen pRb con actividad normal. Además, la acumulación intracelular significativamente elevada de p16 ocurre como respuesta a los niveles elevados de E2F libre, en ausencia de una pRb funcional.⁹¹

En los últimos años se ha demostrado el valor de la expresión de p16 como técnica complementaria en el diagnóstico morfológico de las lesiones preneoplásicas del cérvix uterino ya que mejora la reproducibilidad de criterios entre observadores. Así, Klaes y cols⁹² demostraron un mayor grado de concordancia diagnóstica entre observadores en la evaluación de una serie de 194 muestras de cuello uterino obtenidas por conización con la utilización de p16 en comparación con la evaluación de estas muestras exclusivamente con HE (valor kappa 0,91 [95% intervalo de confianza 0,84-0,99]). La expresión de p16 se limitó a NIC II/NIC III, carcinomas y a NIC I asociadas con el VPH de alto riesgo. Estos autores concluyen que la inmunotinción con p16, permite la identificación precisa incluso de pequeñas lesiones en las secciones de las biopsias y, además, ayuda a reducir la variación entre observadores en el momento de la interpretación.

En nuestro trabajo encontramos que p16 se expresó en el 77,1% de los casos estudiados; los porcentajes de expresión en NIC II, NIC III-Carcinoma *in situ* y carcinomas (microinfiltrantes y condilomatoso) fueron del 78,6%, 93,3% y 100%,

respectivamente. La mayor intensidad de expresión se observó en los NIC III y carcinomas (75% o más de positividad).

Estos resultados coinciden con los publicados en la literatura. Sano y cols⁹³ observaron expresión marcada de esta proteína en todas las lesiones preneoplásicas y también en todos los carcinomas invasores en una serie de 139 biopsias cervicales. Agoff y cols⁹⁴ encontraron que el 91% de los carcinomas de su estudio presentaron una fuerte expresión de p16 pudiendo identificar en estas lesiones genoma de diferentes tipos virales de alto riesgo.

Murphy y cols⁹⁵ plantean el uso de la proteína p16 como marcador diagnóstico en lesiones cervicales. Estos autores demostraron que el grado de inmunotinción de p16 es directamente proporcional al grado de displasia. La expresión de p16 fue nuclear en las muestras catalogadas como NIC I, a diferencia de aquellas muestras clasificadas como NIC II, NIC III y lesiones invasivas donde la expresión fue nuclear y citoplasmática. Kalof y cols⁹⁶ al revisar 44 biopsias de cuello uterino encontraron que 22 de 25 (88%) de los casos de NIC I la expresión de p16 fue focal y/o esporádica y se limitó al 1/3 inferior del epitelio; en cambio 15 de los 17 (88,2%) de las NIC II/III exhibieron inmunotinción que comprometió de 2/3 a todo el espesor epitelial. Además, demostraron VPH de alto riesgo en el 80% de los casos de NIC I y en el 100% de los NIC 2/3. De esta manera, queda de manifiesto que la integración viral al genoma de las células del epitelio cervical es un evento importante en la progresión de la neoplasia cervical y que la expresión de p16 se incrementa al progresar el grado de NIC.

Benevolo y cols⁹⁷ investigaron en paralelo en 100 biopsias cervicales (17 normales, 54 NIC I, 10 NIC II, 11 NIC III y 8 carcinomas invasores) la infección por VPH y la expresión de p16. En ninguno de los casos “normales” se demostró tinción al p16; en cambio, la expresión de p16 fue constante y progresiva al avanzar el grado de la lesión: 31% en NIC I, 90% en NIC II y 100% en NIC III y carcinomas. Estos autores concluyen que el estudio de la expresión de p16 en estas lesiones aporta una alta sensibilidad (84%) y especificidad (98%) en los casos con infección por VPH de alto riesgo (valor predictivo de 97%).

Yildiz y cols⁹⁸ en un estudio muy similar con 35 casos (15 lesiones de bajo grado y 20 de alto grado) obtenidos de especímenes de conización analizaron la expresión de p16 y su relación con VPH, encontrando que todos los casos catalogados como lesiones de alto grado mostraron inmunorreactividad frente a p16 y 80% (12/15) de los de bajo grado. Además, describen un patrón de inmunotinción (50% todo el espesor epitelial, 45% basal y 5% disperso) e intensidad (fuerte o marcada en 70% y variable en 20%) variable.

Por el contrario, otros estudios como los de Jin y cols⁹⁹ reportan un 43,1% de expresión de p16 en carcinomas cervicales y bajo porcentaje de tinción en casos de neoplasias de bajo grado. Sano y cols⁹³, obtienen resultados similares en las neoplasias intraepiteliales de bajo grado. Gupta y cols¹⁰⁰, en un análisis de 100 casos en los que incluyeron 20 muestras de cada tipo histológico (normal, NIC I, II, III y carcinoma escamoso), encontraron negatividad en el epitelio cervical normal y un progresivo incremento de expresión e intensidad de p16 con el aumento del grado de NIC. En los NIC I la expresión solo se observó en 10 casos (50%) y el patrón de tinción se limitó a la capa basal o al 1/3 inferior; en cambio, en NIC II, NIC III y carcinomas escamosos la expresión fue de 60%, 70% y 95%, respectivamente, con un patrón de tinción nuclear o nuclear y citoplasmático y comprometiendo predominantemente todo el espesor del epitelio cervical.

Estos datos coinciden con lo observado en nuestro trabajo, donde encontramos inmunotinción negativa frente a p16 en un 50% de los casos de NIC I, lo que parece indicar que las lesiones de bajo grado manifiestan un comportamiento diferente relacionado probablemente con el tipo de infección por VPH (bajo o alto riesgo).

Hu y cols³⁰ realizaron un estudio en adolescentes de 12 a 19 años para valorar la infección por VPH y la expresión de p16. La serie incluyó 15 muestras de cuello uterino normal o con cervicitis, 48 muestras de NIC I, 46 muestras de NIC II y 52 biopsias de NIC III. Los casos de cérvix normal o con cervicitis no mostraron expresión de p16. El porcentaje de expresión de p16 se incrementó a medida que progresaba el grado de neoplasia intraepitelial (44% en NIC I fue de 44%, 93% en NIC II y 100% en NIC III). Además, el patrón de expresión en los NIC I fue predominantemente focal, mientras que

en los NIC II/III fue difuso y en todo el espesor epitelial. Estos resultados coinciden con los observados en nuestra serie.

Agoff y cols⁹⁴ encontraron en un estudio con 569 muestras expresión de p16 en el 57% de los NIC I, 75% de los NIC II y 91% de los NIC III; en esta misma línea, Ordi y cols²⁹ demostraron que las lesiones del tipo NIC I y asociadas a VPH de bajo riesgo predominantemente no expresan p16. Esto evidencia, que la positividad es un indicador de progresión de la lesión a grados mayores y/o carcinoma invasor.

La expresión de p16 ha demostrado ser también útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones reactivas y lesiones preneoplásicas del cérvix uterino. Redman y cols¹⁰¹, estudiaron 191 muestras de lesiones de cuello uterino encontrando que 30 de 81 casos de NIC I (37%) presentaron inmunotinción positiva al p16; de estos, 11 (37%) mostraron positividad focal y los restantes 19 exhibieron patrón nuclear y citoplasmático difuso. El resto de los casos, correspondientes a procesos reactivos, inflamatorios, atrofia y cambios sugestivos de infección por VPH resultaron negativos. Estos resultados indican que p16 puede ser un marcador importante para diferenciar cambios reactivos y procesos inflamatorios de neoplasias intraepiteliales.

5.2.-Expresión de p53.

La proteína p53 es un biomarcador muy interesante ya por sus múltiples funciones (regulación del crecimiento celular, la apoptosis y el control del ciclo celular) está involucrada en muchas patologías. No sin motivo, el gen *TP53* ha sido designado como el “guardián del genoma”.

Se estima que alrededor del 80 % de los cánceres humanos tienen defectos en la señalización de p53, mientras que aproximadamente la mitad de todos ellos muestran alteraciones estructurales de uno o ambos alelos del gen.¹⁰² La alteración de la función de la proteína p53, por inactivación mediada por la acción de la oncoproteína E6, es clave en el desarrollo de la neoplasia cervical.

Diversos estudios han demostrado resultados contradictorios sobre el papel de p53 en las lesiones neoplásicas del cérvix uterino debido a que no se expresa en el epitelio cervical normal y no siempre se observa inmunomarcaje en los carcinomas.

Algunos autores consideran que la expresión de p53 se incrementa a medida que aumenta el grado de NIC y con la transformación a carcinoma invasor.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Shi y cols¹⁰⁶ encontraron expresión de p53 en relación con el grado de la lesión aunque sin diferencias significativas entre NIC II y III (la positividad en los NIC I fue de 31,6%, 53,4% en los NIC II y 58,2% en los NIC III) en un estudio de 243 casos de NIC.

Otros estudios sugieren que la expresión de p53 en estas lesiones es un evento tardío y sólo es demostrable en NIC III y carcinoma invasor.¹⁰⁷

La inmunotinción para p53 en nuestra serie fue predominantemente negativa (65,7%), especialmente en los casos de NIC I (72,7%). El porcentaje de expresión de p53 en NIC II fue del 42,8% y en NIC III-Carcinoma *in situ* del 35,5%; la expresión se limitó básicamente al 1/3 inferior del espesor epitelial.

Grace y cols¹⁰⁸ estudiaron 105 casos de lesiones cervicales y 20 muestras de cérvix sin alteraciones observando expresión de p53 en el 30% (con intensidad de leve a moderada) en NIC I y II y 100% en NIC III y carcinoma invasor (intensidad moderada). Sin embargo, en nuestro estudio las NIC III fueron en su mayoría negativas (64,5%).

Vasallo y cols¹⁰⁹ en una serie de 78 biopsias cervicales (38 NIC I, 25 NIC II y 15 NIC III) encontraron expresión de p53 en el 33,3% de los casos. La expresión se limitó en todos los casos a pequeños grupos celulares de la capa basal y parabasal. Estos autores no obtuvieron correlación entre la expresión de p53 y la infección por VPH de alto riesgo.

5.3.-Expresión de Ki67.

La proteína Ki67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular y, por tanto, su expresión proporciona una medida directa de la fracción del tejido en proliferación. La expresión de Ki67 ha sido estudiada exhaustivamente en patología neoplásica desde diferentes puntos de vista, tales como el pronóstico o la respuesta a un determinado tratamiento.

En cuello uterino existen diferentes artículos que abordan la utilidad de la proteína Ki67 en el diagnóstico y manejo de las lesiones intraepiteliales. Bulten y cols¹¹⁰ estudiaron biopsias de 22 pacientes con diagnósticos de NIC I, II y III y en sus

resultados observaron una expresión progresiva de Ki67 en el espesor epitelial a medida que progresaba el grado de la lesión. Nam y cols¹¹¹ analizaron el índice de proliferación celular y la apoptosis en neoplasias cervicales. Para ello, seleccionaron 10 muestras normales de cuello uterino, 20 de neoplasias de bajo grado, 20 de alto grado y 10 carcinomas invasores. Observaron que la proporción de expresión se fue incrementando con el grado de la lesión: 13,4% en tejido normal, 37,8% en neoplasias de bajo grado, 67,9% en neoplasias de alto grado y 77,9% en carcinomas invasores. Hallazgos similares se obtuvieron en el presente trabajo, donde se evidenció una expresión de Ki67 en un 98,6% de los casos estudiados; además, la expresión de Ki67 fue aumentando progresivamente al avanzar el grado de la lesión.

Kruse y cols¹¹² en una serie de 65 casos determinaron que la inmunocuantificación de Ki67 es útil para distinguir los diferentes grados de NIC e incluso puede ser un indicador de la progresión de la lesión. De igual manera, Kruse y cols^{113,114} en años sucesivos y en otros estudios con 90 y 237 biopsias cervicales, respectivamente; plantearon que la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de Ki67 se correlaciona con la infección con VPH oncogénico y que, además, este marcador puede ayudar a disminuir la subjetividad en la gradación e interpretación de estas lesiones. Mittal y cols¹¹⁵ plantean que la cuantificación de la expresión de Ki67 puede tener valor para diferenciar entre NIC II / III y lesiones benignas simuladoras, como la atrofia, metaplasia transicional y metaplasia escamosa inmadura.

5.4.-Expresión de Ki67 y p16.

En nuestro estudio se encontramos una concordancia del 75,7% en la expresión de estas dos proteínas; hallazgos similares a los publicados en la literatura. Así, Keating y cols⁸⁸ en un estudio realizado con 104 muestras de cérvix uterino (99 biopsias) que incluían cambios reactivos, atrofia, metaplasia, neoplasias de bajo grado y alto grado, encontraron un porcentaje de expresión de Ki67, ciclina E y p16 del 68,4%, 96,7% y 100%, respectivamente, para las neoplasias de bajo grado y del 94,7%, 91,6% y 100%, respectivamente, para las de alto grado. Además, en este estudio se observó una buena correlación entre la infección por VPH y la expresión de p16, que mostró una inmunorreactividad intensa y difusa en aquellos casos asociados a infección de VPH de alto riesgo.

Walts y cols¹¹⁶ realizaron un estudio para evaluar la eficacia de utilizar las proteínas p16 y Ki67, de modo independiente o en combinación. Para ello analizaron 136 muestras cervicales, de las cuales 39 correspondían a cambios reactivos, 46 a neoplasias de bajo grado (NICI/VPH) y 51 a neoplasias de alto grado (NIC II/III). p16 fue el marcador más sensible y específico. Así, en las neoplasias de bajo grado observaron un alto porcentaje (52%) de negatividad frente a p16, lo que se explica por la ausencia de infección por VPH de alto riesgo en estas lesiones. En esta línea, Yi y cols¹¹⁷ investigaron la relación de la carga viral de VPH de alto riesgo mediante la técnica de captura de híbridos con la expresión inmunohistoquímica de p16 y Ki67 en 8 muestras de NIC I, 12 de NIC II y 41 de NIC III encontrando una correlación positiva con coeficientes de correlación kappa de 0,288, 0,318 y 0,336; respectivamente.

Shi y cols¹⁰⁶ estudiaron la expresión de estos marcadores en 30 muestras de cuello uterino normal y 243 casos de NIC. En el epitelio cervical normal no se encontró inmunomarcaje mientras que todos los casos de NIC fueron positivos. La expresión de p16 y Ki67 fue del 88,2% y 92,1% en los NIC I, respectivamente y ambas proteínas se expresaron en el 100% de NIC II y III. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, donde observamos que la proporción de expresión a nivel del espesor epitelial fue correlativa con el grado de la neoplasia: la expresión en las NIC I se limitó al 1/3 inferior del epitelio mientras que en las NIC II y NICIII se observó afectación de los 2/3 y todo el espesor epitelial, respectivamente.

Nam y cols¹¹⁸ analizaron 31 muestras de cuello uterino obtenidas por conización con los diagnósticos de NIC I (12 casos), NIC II (6 casos) y NIC III (13 casos) observando que la expresión de p16 y Ki67 era proporcional al grado de la neoplasia. La intensidad de la expresión de p16 se incrementó en aquellos casos con infección por VPH de alto riesgo (serotipos 16 o 58) mientras que la expresión de Ki67 no mostró diferencias significativas. Sin embargo, hubo una correlación positiva entre ambos marcadores.

Hongkai y cols¹¹⁹ investigaron la expresión de Ki67 y p16 en lesiones intraepiteliales de cuello uterino. Para ello estudiaron una serie de 67 casos y encontraron positividad para Ki67 en NIC I (47%), II (55%) y III (77%) y para p16 en NIC I (59%), NIC II (72%) y NIC III (91%). Estos autores concluyen que ambos

marcadores se correlacionan y resultan útiles en el diagnóstico diferencial de estas lesiones, incluyendo lesiones inflamatorias y atrofia.

5.5.-Expresión de Ki67 y p53.

En nuestro estudio se observó una concordancia de 34,3% en la expresión de ambos marcadores, porcentaje similar al publicado en la literatura. Bar y cols⁸⁹, demostraron una alta tasa de expresión de Ki67, mientras que la proteína p53 rara vez podría ser detectada. Looi y cols¹²⁰ examinaron el patrón de tinción inmunohistoquímico para Ki67, bcl-2 y p53 en un total de 131 muestras de cérvix uterino (43 correspondientes a cuello normal, 40 a NIC y 48 a carcinomas escamosos). El índice de proliferación evaluado con Ki67 fue mayor en los NIC II/III y carcinomas y mostró correlación con bcl-2 pero no con la expresión de p53.

5.6.-Expresión de p16 y p53.

Como se ha comentado previamente, la proteína p53 en condiciones normales tiene una función reguladora de los procesos de reparación del ADN en el ciclo celular a través de la activación de proteínas que intervienen tanto en la propia reparación como en la detención del ciclo celular hasta que el daño esté reparado. La interacción de la proteína E6 de los VPH de alto riesgo con p53 reduce su vida media y, con ello, su capacidad de activación en los mecanismos celulares que controla. Además de esta alteración de la función normal de p53, existe otra posible alteración sin mediación de infección viral, y es la mutación somática de p53, dando lugar a una forma más estable de la proteína, con lo que los niveles alterados de esta proteína también determinan una alteración en los mecanismos de control del ciclo celular. Precisamente, el hecho de que con relativa frecuencia exista en algunos tumores esta versión mutada de p53 es el principal obstáculo a la hora de valorar sus resultados como marcador de la infección por VPH.

En el presente trabajo encontramos una baja correlación entre la expresión de p16 y p53 (45,7%), encontrándose un 28,6% de coincidencia en la expresión de ambos y un 17,1% de coincidencia en el caso de que ambos marcadores resultaran negativos. Varios estudios han reportado hallazgos similares, destacando que con p53 aun no se ha determinado su sensibilidad y valor predictivo en las lesiones preneoplásicas del cérvix

uterino. Braganca y cols¹²¹ analizaron la expresión y correlación de p16 y p53 en una serie de 125 casos clasificados como NIC I (21 casos), NIC II (17 casos) y NIC III (87 casos); y su correlación, encontrando que el 79,2% de los casos fueron positivos frente a p16, siendo este porcentaje significativamente mayor en las lesiones de alto grado. La expresión de p53 no presentó diferencias según el estrato epitelial y no se correlacionó con p16, con el grado de NIC ni con las infecciones por VPH de alto riesgo.

Wang y cols¹²² estudiaron 22 casos de carcinomas de células pequeñas de cuello uterino y encontraron ADN de VPH en 100% de los casos (en un 82% correspondiente al serotipo 18). Las células tumorales mostraron una intensa tinción nuclear frente a p16 en el 91% de los casos; en cambio, no se detectó expresión de p53 en ninguno de ellos.

5.7.-Expresión de survivina.

Como hemos visto previamente, la survivina es una proteína bifuncional implicada en los mecanismos de regulación de la división celular y supresión de la apoptosis. Se expresa de manera abundante en los tejidos fetales pero desaparece en el tejido normal adulto diferenciado, aunque cada vez hay más evidencias que demuestran su expresión en células adultas normales, particularmente células hematopoyéticas primitivas, linfocitos T, neutrófilos y células endoteliales regulando su proliferación y supervivencia.¹²³

Numerosos estudios relacionan la expresión de survivina con variables clinicopatológicas como mayor agresividad biológica, menor supervivencia, resistencia a la quimioterapia e incremento de la recidiva tumoral. De esta manera, la survivina se ha convertido en una diana molecular y la terapia antisurvivina constituye una estrategia atractiva en el tratamiento del cáncer.

La expresión de survivina se ha estudiado en diferentes tipos de carcinomas, como pulmón¹²⁴, mama¹²⁵, colon¹²⁶, esófago y estomago¹²⁷, páncreas¹²⁸, vejiga¹²⁹ y piel¹³⁰. También ha sido analizada en neuroblastoma¹³¹, melanoma¹³², sarcomas de partes blandas¹³³, leucemias¹³⁴ y linfomas no Hodgkin de alto grado.¹³⁵

En el área ginecológica, Takai y cols¹³⁶ analizaron la expresión de survivina en 20 casos de endometrio no tumoral y 31 casos de carcinoma, encontrando intensa

inmunorreactividad nuclear y/o citoplasmática en las células tumorales que correlacionaron con el índice de proliferación, estadio clínico, grado histológico, evolución y supervivencia. Sui y cols¹³⁷ analizaron 103 casos de tumores epiteliales de ovario encontrando expresión de survivina en el 21,2% (7 de 33 casos) de los tumores benignos, el 47,8% (11 de 23 casos) de los tumores *borderline* y el 51,1% (24 de 47 casos) de los carcinomas. La proporción de casos positivos fue significativamente mayor en los tumores malignos y los *borderline* que en los benignos.

También se ha estudiado su expresión en neoplasias de cuello uterino. Kim y cols¹³⁸ evaluaron el posible papel de survivina en la progresión de la NIC estudiando 41 casos con diagnóstico de NIC y carcinoma escamoso. En esta serie, la expresión de survivina fue progresiva: NIC I 66,7%, NIC II-III 87,5% y carcinomas escamosos 100%.

Lu y cols¹³⁹ estudiaron 41 casos de carcinoma de cérvix, 17 casos de NIC y 10 casos de cérvix normal encontrando que la expresión de survivina fue significativamente mayor en los carcinomas que en las NIC y el grupo normal. Además, la supervivencia media de las pacientes con cáncer y expresión de survivina fue menor a la de las pacientes con tumores negativos. Por tanto, la evaluación inmunohistoquímica de survivina puede resultar útil como marcador de pronóstico. En este sentido, Lee y cols¹⁴⁰ plantean que la expresión de survivina puede aportar información pronóstica pero no se correlaciona con la supervivencia de las pacientes.

Frost y cols⁸¹ demostraron una relación importante entre la expresión de survivina y la infección por VPH y consideraron la expresión de esta proteína como un indicador precoz de malignidad. En esta serie de 73 muestras (31 de cérvix normal, 17 lesiones de bajo grado, 15 lesiones de alto grado y 10 carcinomas escamosos), la inmunohistoquímica frente a survivina reveló tinción nuclear en la mucosa normal, lesiones de bajo grado y alto grado con mayor intensidad en los casos donde se evidenció infección por VPH mediante hibridación *in situ*. La tinción citoplasmática fue observada en metaplasia escamosa inmadura y en los carcinomas escamosos. Branca y cols⁸³ encontraron una relación significativa entre el grado de la lesión, la intensidad de expresión y la infección por VPH de alto riesgo en una serie de 302 muestras de cuello uterino entre las que se incluyeron 152 casos de NIC y 150 casos de carcinoma. En esta

serie no se detectó expresión de survivina en el epitelio cervical normal o en áreas de metaplasia escamosa. Estos autores sugieren que la survivina parece ser un marcador precoz de la carcinogénesis cervical.

En nuestro estudio, se valoró la expresión nuclear de survivina y los resultados obtenidos fueron similares a los descritos en la literatura. Se observó expresión de survivina en el 95.5% de las NIC I, con inmunomarcaje confinado al 1/3 inferior del epitelio. En las NIC II-III y carcinomas el porcentaje osciló entre el 50 y el 66,70%, con un patrón de expresión progresivo del espesor epitelial.

5.8.-Expresión de survivina y p16.

La capacidad de discriminación entre VPH de alto riesgo y bajo riesgo parece ser similar para survivina y p16 y la sobreexpresión está relacionada significativamente con la presencia de VPH de alto riesgo en NIC y carcinomas.¹⁴¹ En nuestro estudio observamos que a medida que la proteína p16 se expresa en mayor porcentaje la expresión de survivina compromete mayor porcentaje del espesor epitelial, estableciéndose una adecuada correlación sobre todo en lesiones de alto grado y carcinomas. Hallazgos similares han sido descritos por Guo y cols¹⁴² en una serie de 36 casos de carcinomas escamosos, 66 de NIC (20 casos de NIC I, 20 de NIC II y 26 de NIC III) y 10 casos de cérvix normal quienes describen inmunorreactividad frente a p16 en NIC I (70%), II (75%), III (69,23%) y carcinoma (66,67%) y para la survivina en el 86,67%, 100%, 76,92% y 55,56% de los casos; respectivamente. La correlación entre ambos marcadores fue significativa. Tan y cols¹⁴³ observaron una relación lineal entre la expresión de p16 y el incremento del grado de NIC (positividad de 25,4% para NIC I, 42,9% para NIC II, 95,9 en NIC III y 98,6% en carcinomas) en una serie de 201 casos entre los que incluyeron 129 NIC y 72 carcinomas escamosos. En este estudio, la survivina no se correlacionó con el incremento del grado de NIC: la expresión fue de 56,7% en NIC I, 33,4% en NIC II, 87,5% en NIC III y 98,6% en carcinomas escamosos.

5.9.- Expresión de survivina y p53.

En nuestra serie encontramos una baja correlación entre la expresión inmunohistoquímica de estas dos proteínas fundamentalmente debido a que la p53 fue predominantemente negativa y en aquellos casos en que resultó positiva, no se

correspondió con el compromiso de tinción del espesor epitelial de la survivina. Una posible explicación a este hecho es que p53 es eliminada por la oncoproteína viral E6. Diferentes estudios han descrito que la survivina es uno de los genes que se reprime transcripcionalmente por p53 y la expresión de survivina antagoniza la muerte celular inducida por p53.¹⁴⁴

Parenti y cols¹⁴⁵ encontraron en un estudio con 40 casos de esófago de Barrett, 11 displasias de bajo grado y 19 displasias de alto grado que la expresión de survivina fue significativamente mayor que la de p53. Otros autores, como Khan y cols¹⁴⁶ observaron correlación entre la expresión de p53 y survivina. Estos autores investigaron la distribución de estas proteínas en lesiones orales (16 premalignas y 29 carcinomas) y demostraron inmunorreactividad en el 72% de los carcinomas orales y el 44% de las lesiones premalignas. Aproximadamente la mitad de los carcinomas y lesiones premalignas con expresión de p53 también mostraron inmunomarcaje con la survivina (28% de carcinomas y 18% lesiones premalignas). Además, observaron que el número de células con expresión de survivina fue mayor en el grupo de lesiones p53-positivas.

5.10.-Expresión de survivina y Ki67.

Como se ha comentado anteriormente, la proteína Ki67 es un marcador de proliferación celular ampliamente utilizado en patología. Sin embargo, pocos estudios lo han relacionado con la survivina. En nuestro trabajo se demuestra que el porcentaje de células con expresión de Ki67 se correlaciona con la expresión de survivina en relación al porcentaje de espesor epitelial afectado: 75,9% cuando se compromete 1/3 del espesor epitelial y 76,2% cuando se afecta la totalidad del espesor epitelial.

Wu y cols¹⁴⁷ encontraron una buena correlación entre los niveles de survivina y la actividad proliferativa, analizada con Ki67, en una serie de 128 muestras de carcinoma transicional de vejiga.

5.11.-Expresión de Aurora A y Aurora B.

En las células normales la mitosis es estrictamente regulada para mantener el contenido diploide de los cromosomas; en cambio, en las células cancerosas ocurren cambios en la cantidad y/o organización del ADN debido a errores en la división, resultando en inestabilidad en los cromosomas y aneuploidia. De hecho, dos

características importantes de las células cancerosas son la pérdida de control de los puntos reguladores del ciclo celular y un cambio en la organización de la cantidad de ADN comparado con las células normales. Los cambios en la cantidad de ADN son debido a la ganancia o pérdida de cromosomas como resultado de la incorrecta segregación durante la mitosis.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la biología y funciones de las Aurora quinasas, que aparecen como dianas terapéuticas prometedoras para el tratamiento del cáncer ya que se ha descrito su sobreexpresión en una amplia variedad de neoplasias humanas.

En nuestro estudio la expresión de Aurora A (citoplasmática y/o nuclear) fue predominantemente débil (55,7%). En los casos de NIC I la expresión de la proteína se limitó al 1/3 inferior en un 90,9%, mientras que en las NIC II alcanzó los 2/3 del espesor del epitelio en un 50% de los casos; en las NIC III-Carcinoma *in situ* y los microinvasores se observó expresión de Aurora A en todo el espesor del epitelio en un 35,5% y 100% de los casos, respectivamente. En el caso de la Aurora B, la expresión inmunohistoquímica fue observada a nivel nuclear. La expresión de Aurora B fue progresiva en las NIC I y II, es decir, osciló de 1/3 a 2/3 del espesor epitelial mientras que en las NIC III-Carcinoma *in situ* y carcinomas microinvasores el patrón de immunoexpresión de Aurora B se observó entre los 2/3 y todo el espesor epitelial en una misma proporción. Por tanto, en el caso de Aurora B la expresión de la proteína no se relacionó de forma tan significativa con el grado de lesión. En nuestra revisión de la literatura únicamente hemos encontrado dos trabajos recientes que hace referencia al papel de las Aurora quinasas en las neoplasias intraepiteliales y el cáncer del cérvix uterino.^{148,149} Twu y cols¹⁴⁸ examinaron 20 muestras normales de cérvix uterino, 35 NIC III y 95 casos de carcinomas en los que se incluyeron carcinoma de células escamosas (n=76) y adenocarcinomas (n=19). Aurora A mostró principalmente un patrón de tinción nuclear tanto en los NIC como en carcinomas pero no en el cérvix normal. En los casos de NIC III y carcinomas escamosos observaron expresión de Aurora A en el 37,1% (13/35) y en el 50% (38/76) de los casos, respectivamente. No observaron correlación significativa (intensidad o distribución) entre NIC III y carcinoma; en cambio, sí observaron diferencias significativas entre carcinomas escamosos y adenocarcinomas (50% frente a 21,1% de expresión). Respecto a la Aurora B,

encontraron expresión nuclear en uno de los casos de cérvix normal (5%), 38,2% (13/34) de los NIC III y en el 56,2% (41/73) de los carcinomas escamosos. Este trabajo no considera el compromiso del espesor epitelial ni tampoco incluye lesiones tipo NIC I y NIC II en las que pudiera analizarse la expresión de las Aurora quinasas en relación a la progresión de las lesiones estos autores indican una expresión significativamente alta en los casos de carcinoma y NIC III comparada con la expresión observada en las muestra de cérvix normal. Al igual que en nuestro estudio, la expresión de Aurora A mostró una correlación positiva con la expresión de Aurora B. En esta misma línea, Zhang y cols¹⁴⁹ analizaron la expresión de Aurora A en una serie de 74 carcinomas de cérvix uterino mediante RT-PCR, *Western blot* e inmunohistoquímica encontrando que los niveles de expresión de esta proteína fueron significativamente superiores en los carcinomas respecto al tejido normal. Además, la expresión de Aurora A se correlacionó con el estadio FIGO de los tumores, con el grado de diferenciación tumoral, infiltración parametrial y presencia de metástasis en ganglios linfáticos o a distancia. Las pacientes con elevada expresión de Aurora A presentaron un menor período libre de enfermedad y una menor supervivencia. El análisis multivariante demostró que la elevada expresión de Aurora A a nivel de ARNm tiene valor pronóstico independiente por lo que estos autores concluyen que Aurora A puede ser un biomarcador pronóstico en el carcinoma del cérvix uterino.

Un aspecto importante a considerar al analizar la expresión de las Aurora quinasas es el porcentaje de células inmunomarcadas, que en la literatura oscila entre el 26 y el 94% para Aurora A⁶⁶ a diferencia de lo encontrado por nosotros (2-22%). En el caso de Aurora B, el porcentaje de células teñidas osciló entre el 3 y el 39%, similar al publicado por Qi y cols¹⁵⁰ en carcinomas escamosos orales (n=40) en diferentes etapas de diferenciación, con un promedio de expresión que osciló del 4,4% al 16,5%. En el caso de la Aurora B hay que resaltar que la expresión nuclear es funcionalmente relevante ya que varios estudios han identificado la histona H3 como un sustrato importante de esta proteína.^{151,152}

Si revisamos brevemente los datos publicados en relación a la expresión de las Aurora quinasas A y B en otras neoplasias de la esfera ginecológica encontraremos que la mayoría de los trabajos indican que la expresión de estas proteínas se asocia a un

comportamiento tumoral más agresivo y a una menor supervivencia de las pacientes. En este sentido, Chen y cols¹⁵³ estudiaron 156 muestras de carcinomas de ovario y encontraron sobreexpresión de Aurora B en 53 casos (34%), con una mayor expresión en los tumores pobre y moderadamente diferenciados respecto a los bien diferenciados (53,6% *versus* 28,2% *versus* 10%, respectivamente). La sobreexpresión también fue mayor en aquellos casos con metástasis a ganglios linfáticos y líquido ascítico positivo. Además, el grupo de tumores con mayor expresión presentó una menor supervivencia. Kulkarni y cols¹⁵⁴ analizaron la expresión de Aurora A y B entre otros marcadores en una serie de 143 pacientes con carcinomas de ovario estudiando la correlación con la ploidia y el grado tumoral. Landen y cols¹⁵⁵ encontraron sobreexpresión de Aurora A en el 82,8% de los casos de una serie de 70 carcinomas de ovario. Estas observaciones coinciden con lo planteado por Kurai y cols en carcinomas endometriales⁶⁶, donde la expresión se correlacionó inversamente con el grado de diferenciación. Sin embargo, Mendiola y cols⁵⁵ analizando la expresión de Aurora quinasas en una serie de 68 carcinomas de ovario, encontraron que los tumores con expresión de Aurora A presentaron una mayor tasa de supervivencia, lo que indica que todos estos datos deben ser analizados con cautela y que es necesario el estudio de series más amplias de tumores para tratar de dilucidar el verdadero valor de la expresión de las Aurora quinasas en este tipo de lesiones.

5.12.- Expresión de Aurora quinasas y Ki67.

En nuestro estudio observamos correlación positiva entre el porcentaje de células inmunoteñidas con Ki67 y el porcentaje de expresión de las Aurora quinasas A y B en relación al espesor epitelial. Existió una ligera variación en relación a Aurora B cuando sólo se afectan los 2/3 del espesor epitelial, por cuanto que se sigue observando un porcentaje alto de expresión de Ki67 en estos casos.

En la revisión de la literatura no hemos encontrado artículos que analicen la relación de estos marcadores en cuello uterino pero sí en otras neoplasias. Así Kulkarni y cols¹⁵⁴ demostraron la correlación de Ki67 con la expresión de Aurora A y B en carcinomas de ovarios, indicando proliferación y reentrada al ciclo celular de las células tumorales. Qi y cols¹⁵⁰ observaron un patrón similar de expresión entre Ki67 y Aurora B en carcinomas escamosos orales. El incremento de Aurora B fue acompañado de un

incremento proporcional del índice de proliferación estimado con Ki67. Hallazgos divergentes encontraron Mendiola y cols⁵⁵ en carcinomas de ovarios en los que la expresión de Aurora B no se asoció con el índice de proliferación, aunque la expresión de Aurora A se asoció a la de Ki67 en un 80% de los casos. Kurai y cols⁶⁶ revisaron 73 casos de carcinoma de endometrio, 30 de hiperplasia endometrial y 40 endometrios normales y compararon la expresión de Aurora A, Aurora B y Ki67. La expresión de Aurora A fue citoplasmática y en el endometrio normal se encontró principalmente en la fase proliferativa disminuyendo en la fase secretora. La expresión de Aurora A aumentó significativamente en los carcinomas; sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, no hubo correlación con la expresión de Ki67. En este estudio, la expresión de Aurora B fue nuclear y en el endometrio normal fue significativamente mayor en la fase proliferativa que en la fase secretora. En los carcinomas, la expresión se correlacionó con la expresión de Ki67 y fue mayor en los carcinomas de alto grado.

5.13.-Expresión de Aurora quinasas y p53.

La relación entre la expresión de Aurora A y p53 es un factor importante en la carcinogénesis ya que p53 interactúa con Aurora A y suprime su actividad oncogénica.⁶⁰ Aurora A es clave en la vía de regulación de p53, y estudios previos demuestran que la elevada expresión de Aurora A fosforila a p53 e incrementa su degradación, facilitando de este modo la transformación oncogénica.⁵⁸ La fosforilación de p53 está asociada con la progresión regulada del ciclo, supervivencia celular y transformación. Así, la alteración de este mecanismo de regulación mutua entre Aurora A y p53 conduce a las anormalidades en puntos de control e inestabilidad de centrosomas. El efecto de la expresión de Aurora A en células en división es variable dependiendo del estado de p53 y otras moléculas afines.¹⁵⁶ Si se pierde la regulación de p53 y la célula dañada es incapaz de evitar la siguiente duplicación del ADN, entra en mitosis y se produce aneuploidia y cáncer.⁴³

No hemos encontrado artículos que estudien la relación de estos marcadores en cuello uterino. Dentro del área ginecológica; Mendiola y cols⁵⁵ no encontraron relación entre la expresión de Aurora A y B y el estado de p53 en un estudio realizado en carcinomas de ovario. Estos hallazgos son similares a los que hemos encontrado en nuestro trabajo sobre lesiones del cérvix uterino donde observamos una baja correlación

entre la expresión de p53, Aurora A y Aurora B, fundamentalmente debido a la gran cantidad de casos negativos frente a p53.

5.14.-Expresión de Aurora quinasas y p16.

La relación obtenida en nuestro estudio entre la expresión de p16 y las Aurora quinasas A y B resultó significativa. Así, observamos que a medida que las células presentaban expresión de p16 también existía una mayor expresión de las Auroras quinasas en relación al espesor epitelial. Lam y cols¹⁵⁷ encuentran hallazgos similares al revisar la expresión de Aurora quinasas en una serie de 200 pacientes con carcinomas colorectales. Se demostró expresión de Aurora quinasas en el 48,5% de los carcinomas, con un porcentaje de expresión variable entre el 10 y el 50% de las células tumorales. Esta expresión se correlacionó con la de la proteína p16, ya que esta última se observó en el 90% de los carcinomas con expresión de Aurora quinasas.

5.15.-Expresión de Aurora quinasas y survivina.

La survivina, más allá de su papel como inhibidor de la apoptosis, es una subunidad de las proteínas pasajeras, de manera tal que este planteamiento teórico coincide con nuestros resultados que demostraron correlación entre la expresión de survivina, Aurora A y Aurora B con un aumento progresivo relacionado con el grado de lesión; el porcentaje de células con expresión de survivina fue significativamente mayor en aquellas patologías de mayor gravedad (NIC III-Carcinoma *in situ* y carcinomas condilomatoso-microinfiltrantes). Tampoco en este caso hemos encontrado estudios que analicen esta correlación a nivel del cérvix uterino aunque sí en otras neoplasias. Qi y cols¹⁵⁸ de manera similar a nuestros hallazgos, observaron una correlación significativa entre la expresión de survivina, Aurora B y Ki67 en carcinomas de cabeza y cuello. Los casos con expresión nuclear de survivina y Aurora B mostraron un comportamiento biológico agresivo. Vischioni y cols¹⁵⁹ evaluaron la expresión de Aurora B y survivina en una serie de 160 casos de carcinoma de pulmón de célula grande en diferentes estadios y variantes (49 adenocarcinomas, 79 carcinomas escamosos y 32 carcinomas indiferenciados de célula grande). La expresión de Aurora B se correlacionó con la expresión nuclear de survivina pero no con la expresión de p16. López-Rios y cols⁶² estudiaron muestras de 99 pacientes con mesoteliomas, encontrando que la expresión de

Aurora A, Aurora B y survivina fue mayor en los mesoteliomas sarcomatoides y en los grupos de peor pronóstico.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

- 1) La expresión inmunohistoquímica de p16 resulta proporcional al grado de la neoplasia intraepitelial y su expresión es especialmente útil en la detección de las lesiones de alto grado (NIC II y NIC III-Carcinoma *in situ*).
- 2) En las neoplasias intraepiteliales de bajo grado (NIC I) la expresión de p16 tiende a ser generalmente baja.
- 3) La inmunotinción con Ki67 muestra una relación directa con el grado de la neoplasia intraepitelial.
- 4) Se encontró una buena correlación entre la expresión de p16 y Ki67.
- 5) La inmunoexpresión de p53 fue predominantemente negativa en las muestras de NIC de diversos grados.
- 6) La correlación entre la expresión de p53 con p16 y Ki67 resultó muy baja.
- 7) En el caso de la survivina se valoró la tinción nuclear y se observó que a medida que avanza el grado de lesión el patrón de expresión compromete en mayor proporción el espesor epitelial.
- 8) La inmunotinción con Aurora A (expresión citoplasmática y/o nuclear) fue predominantemente débil en los casos evaluados y mostró un patrón progresivo acorde con el grado de la neoplasia.
- 9) La expresión de Aurora B fue predominantemente nuclear. La mayoría de los casos mostraron reactividad entre el 1/3 inferior y los 2/3 del espesor epitelial, con menor relación con el grado histológico de la lesión intraepitelial.
- 10) La expresión inmunohistoquímica de survivina, Aurora B y Aurora A aumentó progresivamente a medida que progresó el grado de lesión intraepitelial.

- 11) La correlación entre la expresión inmunohistoquímica de p16, survivina, Aurora A, Aurora B y Ki67 resultó ser significativa, sobre todo cuando la expresión de estas proteínas fue superior al 1/3 inferior del epitelio.
- 12) Se observó una baja correlación entre la expresión de p53, survivina, Aurora A y Aurora B; fundamentalmente por la gran cantidad de casos que no expresaron p53.
- 13) En los casos de NIC I, todos los marcadores utilizados exhibieron predominio de tinción en el 1/3 inferior del espesor epitelial, con una mayor expresión de survivina, Aurora A y Aurora B.
- 14) En los casos de NIC II, el inmunomarcaje predominó en los 2/3 del espesor epitelial, con un comportamiento similar entre los anticuerpos analizados, a excepción de p53 y Aurora B que mostraron una tendencia a la expresión en el 1/3 basal del epitelio.
- 15) En los NIC III-Carcinomas *in situ*, el inmunomarcaje con los anticuerpos se observó predominantemente en todo el espesor epitelial, especialmente en el caso de Ki67 y survivina.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Suárez C, Mijares A, Castillo L, Briceño J. Tipificación del VPH en cáncer de cuello uterino. *Rev Venez Oncol* 2006;18:221-5.
- 2) Organización Mundial de la Salud. 140 Sesión del Comité Ejecutivo. Washington, DC. EUA, 2007.
- 3) National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End Results. <http://seer.cancer.gov>.
- 4) Anuarios de Mortalidad. Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social. 2004 y 2006
- 5) Wright T, Kurman R, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. En: Kurman R (ed). *Blaustein's pathology of the female genital tract*, 5th ed. Springer-Verlag: New York, 2002.
- 6) De Cherney A, Nathan L, Murphy Goodwin T, Laufer N (eds). *Current diagnosis and treatment in Obstetrics and Gynecology*. 10th ed. McGraw-Hill: San Francisco, 2007.
- 7) Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
- 8) Puig-Tintoré LM, Cortés J, Castellsagué X, y cols. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol* 2006;49:5-62.
- 9) Castellsagué X, LLongueras S, Bosch F. Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas. En: Carreras R, Xercavins J, Checa MA (eds). *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero*. Editorial Panamericana: Madrid, 2008.
- 10) Anderson S, Brooke PK, Van Eyck SL, Noell H, Frabe WJ. Distribution of human papillomavirus types in genital lesions from two temporally distinct populations determined by in situ hybridization. *Hum Pathol* 1993;24:547-53.
- 11) Barboza O, Garza R. Virus del Papiloma Humano En: Alonso P, Lazcano E, Hernández M (eds). *Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. 2^a ed. Editorial Panamericana: Buenos Aires, 2005.
- 12) Lie AK, Kristensen G. Human Papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:405-15.
- 13) Mancebo G, Fusté P, Checa M, Carreras R. Papel del virus del papiloma humano en la carcinogénesis cervical. En: Carreras R, Xercavins J, Checa MA (eds). *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero*. Editorial Panamericana: Madrid, 2008.
- 14) Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007;98:1505-11.
- 15) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, y cols. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-4.

- 16) Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
- 17) Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991;184:9-13.
- 18) Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994;68:4262-73.
- 19) Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interaction of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992;12:197-217.
- 20) Keen N, Elston R, Crawford L. Interaction of the E6 protein of human papillomavirus with cellular proteins. *Oncogene* 1994;9:1493-9.
- 21) Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75:495-505.
- 22) Jo H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Ther* 2005;3:419-34.
- 23) Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 2009;384:324-34.
- 24) Cooper G, Hausman R (eds). *La célula*. 4ª ed. Marbán Libros: Madrid, 2008.
- 25) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7.
- 26) Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins Patología humana* 8ª ed, Elsevier: Amsterdam, 2008.
- 27) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-6.
- 28) Kamb A, Gruis N, Weaver Feldhaus J, y cols. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-40.
- 29) Ordi J, Garcia S, Del Pino M, y cols. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol* 2009;28:90-7.
- 30) Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005;18:267-73.
- 31) López M, Anzola M, Cuevas-Salazar N, Aguirre JM, Martínez de Pancorbo M. p53, un gen supresor tumoral. *Gac Med Bilbao* 2001;98:21-7.
- 32) Harris CC, Holstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-27.
- 33) Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, y cols. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Hum Mutat* 2003;21:307-12.

- 34) Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J, Nigg EA. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* 1999;1:88-93.
- 35) Loncarek J, Kisurina-Evgenieva O, Vinogradova T, y cols. The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces. *Nature* 2007;450:745-9.
- 36) Ducat D, Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* 2004;301:60-7.
- 37) Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR. Mitotic mechanics: the Auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:672-83.
- 38) Warner SL, Bearss DJ, Han H, Von Hoff DD. Targeting Aurora-2 kinase in cancer. *Mol Cancer Ther* 2003;2:589-95.
- 39) Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:1572-7.
- 40) Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in Aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 1995;81:95-105.
- 41) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396: 643-9.
- 42) Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, y cols. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol* 2000;10:1075-8.
- 43) Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:1-10.
- 44) Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN Jr, Gandara DR. Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer Res* 2008;14:1639-48.
- 45) Keen N, Taylor S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2004;4:927-36.
- 46) Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A-a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005;5:42-50.
- 47) Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:29-36.
- 48) Bichoff JR, Anderson L, Zhu Y, y cols. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998;17:3052-65.
- 49) Zhou H, Kuang J, Zhong L, y cols. Tumor amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998; 20:189-93.
- 50) Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to taxol. *Cancer Cell* 2003;3:51-62.
- 51) Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *EMBO J* 2002;21:483-92.

-
- 52) Watanabe T, Imoto I, Katahira T, y cols. Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1114-22.
- 53) Tanner MM, Grenman S, Koul A, y cols. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1833-9.
- 54) Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, y cols. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1420-6.
- 55) Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, y cols. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:631-8.
- 56) Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Cassia R, y cols. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697-702.
- 57) Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005;437:1043-7.
- 58) Katayama H, Sasai K, Kawai H, y cols. Phosphorylation by Aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 2004;36:55-62.
- 59) Liu Q, Kaneko S, Yang L, y cols. Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem* 2004;279:52175-82.
- 60) Chen SS, Chang PC, Cheng YW, Tang FM, Lin YS. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J* 2002;21:4491-9.
- 61) Zeng WF, Navaratne K, Prayson RA, Weil RJ. Aurora B expression correlates with aggressive behavior in glioblastoma multiforme. *J Clin Pathol* 2007;60:218-21.
- 62) Lopez-Rios F, Chuai S, Flores R, y cols. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of Aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res* 2006;66:2970-9.
- 63) Adams RR, Eckley DM, Vagnarelli P, y cols. Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumor cells. *Chromosoma* 2001;110:65-74.
- 64) Katayama H, Brinkley WR. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:451-64.
- 65) Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, y cols. A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia, *Mol. Cancer Ther* 2007;6:1851-7.
- 66) Kurai M, Shiozawa T, Shih HC, y cols. Expression of Aurora kinases A and B in normal, hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36:1281-8.
- 67) Vucic D, Fairbrother WJ. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:5995-6000.

- 68) Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009;35:553-62.
- 69) Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2008;14:5000-5.
- 70) Uren AG, Wong L, Pakusch M, y cols. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 2000;10: 1319-28.
- 71) Ambrosini, G, Adida, C, Altieri, DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
- 72) Adida C, Haioun C, Gaulard P, y cols. Prognostic significance of survivin expression in diffuse B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921-5.
- 73) Altieri, DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46–54.
- 74) Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, y cols. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 2003;82:923-8.
- 75) Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, y cols. Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res* 2007;27:2803-8.
- 76) Brennan D J, Rexhepaj E, O'Brien SL, y cols. Altered cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin is a prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2681-9.
- 77) Ye CP, Qiu CZ, Huang ZX, y cols. Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:6264-8.
- 78) Mohamed S, Yasufuku K, Nakajima T, y cols. Nuclear survivin in pN2 nonsmall cell lung cancer: prognostic and clinical implications. *Eur Respir J* 2009;33:127-33.
- 79) Bhanot U, Heydrich R, Möller P, Hasel C. Survivin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): steady increase along the developmental stages of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2006;30:754-9.
- 80) Shirai K, Suzuki Y, Oka K, y cols. Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma. *J Neurooncol* 2009;91:353-8.
- 81) Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, y cols. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002;117:738-44.
- 82) Saitoh Y, Yaniguma Y, Ishikawa M. Analysis of Bcl-2, Bax and survivin genes in uterine cancer. *Int J Oncol* 1999;15:137-41.
- 83) Branca M, Giorgi C, Santini D, y cols. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2005;124:113-21.

- 84) Gerdes J, Li L, Schlueter C, y cols. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.
- 85) Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000;257:231-7.
- 86) Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
- 87) Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, Vereecken AJ, Van Marck E, Bogers JJ. Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool?. *J Clin Pathol* 2003;56:681-6.
- 88) Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, y cols. Ki-67, cyclin E and p16INK4 are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25:884-91.
- 89) Bar JK, Harlozinska A, Markowska J, Nowak M. Studies on tumor proliferation using monoclonal antibody, Ki-67 and expression of p53 in cancer of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996;17:378-80.
- 90) Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical analysis of gynecologic tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2001;20:64 -78.
- 91) Khleif SN, DeGregory J, Yee CL, y cols. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4350-4.
- 92) Klaes R, Benner A, Friedrich T, y cols. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389-99.
- 93) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153:1741-8.
- 94) Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki67 expression and detection of high risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16:665-73.
- 95) Murphy N, Heffron CC, King B, y cols. p16INK4a positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Arch* 2004;445:610-5.
- 96) Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4a immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:674-9.

- 97) Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, y cols. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006;19:384-91.
- 98) Yıldız IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhanb A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract* 2007;203:445-9.
- 99) Jin SL, Zhang ZS, Yang YH. The expression of p16 and Rb protein in the tissue of cervical squamous carcinoma (abstract). *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2000;25:393-6.
- 100) Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. Protein p16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:7-11.
- 101) Redman R, Rufforny I, Liu Ch, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16(Ink4a) in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:795-9.
- 102) Donehower LA. Does p53 affect organismal aging?. *J Cell Physiol* 2002;192:23-33.
- 103) García Tamayo J. Una actualización sobre la ayuda de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. *Academia Biomédica Digital* 2007 No.-32. Vitae.ucv.ve
- 104) Ngan HY, Tsao SW, Liu SS, Stanley M. Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer. A study at protein, RNA and DNA levels. *Genitourin Med* 1997; 73:54-8.
- 105) Horn LC, Fisher U, Hänel C, Kuhn H, Raptis G, Bilek K. p53 in surgically treated and pathologically staged cervical cancer: correlation with local tumor progression, but not with lymphatic spread. *Pathol Res Pract* 2001;197:605-9.
- 106) Shi J, Zheng JS, Yin F, Hu WW, Huang XJ, Zhou XL. Association of p16, p53, Ki-67 expressions with high-risk human papilloma virus infection in cervical intraepithelial neoplasia (abstract). *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007;27:515-7.
- 107) Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001;82:238-46.
- 108) Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003;91:51-8.
- 109) Vasallo J, Derchain SF, Pinto GA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Andrade LA. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;71:45-8.
- 110) Bulten J, Van Der Laak JA, Gemmink JH, Pahlplatz MM, De Wilde PC, Hanselaar AG. MIB1, a promising marker for the classification of cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 1996;178:268-73.

- 111) Nam JH, Kim JH, Huh J, y cols. Correlation of lesion grade in cervical neoplasia with cell proliferation and apoptosis. *Int J Gynecol Cancer* 1998;8:279-86.
- 112) Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, y cols. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol* 2001;193:48-54.
- 113) Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Van de Goot FR, Kurten N. Relationship between the presence of oncogenic HPV DNA assessed by polymerase chain reaction and Ki-67 immunoquantitative features in cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2001;195:557-62.
- 114) Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, y cols. Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *J Pathol* 2003;199:462-70.
- 115) Mittal K, Soslow R, McCluggage WG. Application of Immunohistochemistry to gynecologic pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:402-23.
- 116) Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 2009;40:957-64.
- 117) Yi W, Wang JL, Li XH, Wei LH. Correlations of high-risk human papillomaviral load to cervical intraepithelial neoplasia grades, expression of Ki-67 and P16ink4a and follow-up (abstract). *Ai Zheng* 2008;27:520-4.
- 118) Nam EJ, Kim JW, Hong JW, y cols. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* 2008;19:162-8.
- 119) Hongkai Z, Qiang D, Meishen Y, Tiehua Z, Lingling Y, Weidong Ch. The Expression of Ki-67, p16 Protein in the lesions of cervix and its diagnostic significance. *Journal of Capital Medical University* 2008;03. <http://en.cnki.com.cn>.
- 120) Looi ML, Dali AZ, Ali SA, Ngah WZ, Yusof YA. Expression of p53, bcl-2 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30:63-70.
- 121) Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, y cols. Expression of p16 and cervical infection with high-risk human papillomavirus are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplásica. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:1060-4.
- 122) Wang HL, Lu DW. Detection of human papillomavirus DNA and expression of p16, Rb, and p53 proteins in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 2004;28:901-8.
- 123) Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1087-98.
- 124) Monzó M, Rosell R, Felip E, y cols. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100-4.

- 125) Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-34.
- 126) Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-74.
- 127) Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:1808-12.
- 128) Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001;92: 271-8.
- 129) Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999;341:452-3.
- 130) Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest* 1999;79:1121-6.
- 131) Islam A, Kageyama H, Takada N, y cols. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19:617-23.
- 132) Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999;113:1076-81.
- 133) Kappler M, Köhler T, Kampf C, y cols. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 2001;95:360-3.
- 134) Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, y cols. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. *Br J Haematol* 2001;114:63-9.
- 135) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
- 136) Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002;184:105-16.
- 137) Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002;21:315-20.
- 138) Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res* 2002;22:805-8.

- 139) Lu S, Zhang B, Wang Z. Expression of survivin, cyclinD1, p21WAF1, caspase-3 in cervical cancer and its relation with prognosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25:78-81.
- 140) Lee JP, Chang KH, Han JH, Ryu HS. Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:113-9.
- 141) Branca M, Ciotti M, Santini D, y cols. p16(INK4a) expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after one treatment or disease outcome in cervical cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2004;23:354-65.
- 142) Guo JF, Yang SJ, Bao SK. Expression and clinical significance of p16(INK4a) and Survivin in uterine cervix cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Inner Mongolia Med J* 2009-01.<http://cnki.com.cn>.
- 143) Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, y cols. Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:1-6.
- 144) Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002;277:3247-57.
- 145) Parenti A, Leo G, Porzionato A, Zaninotto G, Rosato A, Ninfo V. Expression of survivin, p53, and caspase 3 in Barrett's esophagus carcinogenesis. *Hum Pathol* 2006;37:16-22.
- 146) Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, y cols. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* 2009;31:1039-48.
- 147) Wu Y, Wang G, Wei J, Wen X. Survivin protein expression positively correlated with proliferative activity of cancer cells in bladder cancer. *Indian J Med Sci* 2005;59:235-42.
- 148) Twu NF, Yuan CC, Yen MS, y cols. Expression of Aurora kinase A and B in normal and malignant cervical tissue: high Aurora A kinase expression in squamous cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;142:57-63.
- 149) Zhang W, Wang J, Liu SJ, Hua W, Xin XY. Correlation between Aurora-A expression and the prognosis of cervical carcinoma patients. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:521-7.
- 150) Qi G, Ogawa I, Kudo Y, y cols. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch* 2007;450:297-302.
- 151) Ota T, Suto S, Katayama H, y cols. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 2002;62:5168-77.
- 152) Crosio C, Fimia GM, Lorry R, y cols. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22:874-85.
- 153) Chen YJ, Chen ChM, Twu NF, y cols. Overexpression of Aurora B is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Virchows Arch* 2009;455:431-40.

- 154) Kulkarni AA, Loddo M, Leo E, y cols. DNA replication licensing factors and Aurora kinases are linked to aneuploidy and clinical outcome in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:6153-61.
- 155) Landen CN Jr, Lin YG, Immaneni A, y cols. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4098-104.
- 156) Mao JH, Wu D, Perez-Losada J, y cols. Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell* 2007;11:161-73.
- 157) Lam AK, Ong K and Ho YH. Aurora kinase expression in colorectal adenocarcinoma: correlations with clinicopathological features, p16 expression, and telomerase activity. *Hum Pathol* 2008;39:599-604.
- 158) Qi G, Kudo Y, Ando T, y cols. Nuclear survivin expression is correlated with malignant behavior of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol* 2010;46:263-70.
- 159) Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodriguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of Aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2905-13.

8. RESUMEN

8. RESUMEN.

Introducción. El carcinoma de cuello uterino representa un problema de salud pública debido a que es una causa importante de morbilidad a nivel mundial, sobre todo en mujeres de edad reproductiva y, de hecho, constituye la primera causa de muerte por cáncer en países en vías de desarrollo. Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) son consideradas lesiones precursoras y la probabilidad de que progresen depende de diversas situaciones. Entre los diferentes factores implicados en la carcinogénesis del cérvix uterino, la infección por el virus del papiloma humano (VPH) juega un papel determinante. A pesar de la mejora de los métodos de cribado, como la citología, un número significativo de pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas del cáncer. El estudio morfológico a través de la biopsia cervical se considera el patrón de referencia para establecer el diagnóstico de estas lesiones. Las pruebas para determinar la infección viral resultan de gran utilidad aunque pueden no ser suficientes para establecer criterios de progresión y regresión, realizar un diagnóstico diferencial con lesiones simuladoras y establecer una gradación precisa de estas lesiones con vistas a elegir el tratamiento más adecuado. En ese sentido, considerando que la integración del VPH al genoma produce una serie de cambios en el ciclo celular, con expresión anormal de ciclinas y sus factores inhibidores, errores en la mitosis que determinan una segregación cromosómica inadecuada y alteración de los mecanismos de apoptosis, el análisis de biomarcadores moleculares relacionados con esos procesos (p53, Ki67, p16, survivina y Aurora quinasas A y B) puede resultar de utilidad en el abordaje de estas lesiones.

Material y Métodos. En este estudio se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica de una serie de moléculas implicadas en los mecanismos de control del ciclo celular y en la progresión neoplásica de las lesiones preinvasoras de cuello uterino. La muestra estuvo representada por 70 casos correspondientes a biopsias y piezas de conización con los diagnósticos de neoplasia intraepitelial (n=67), carcinoma condilomatoso (n=1) y carcinoma microinfiltrante (n=2). Los casos fueron seleccionados de manera aleatoria de los archivos de la Sección de Patología Ginecológica del Instituto Anatomopatológico “Dr. José A. O’Daly” de la Universidad Central de Venezuela. Se realizó estudio inmunohistoquímico para analizar la expresión de p16, Ki67, p53, Aurora quinasas A y B y survivina en la casuística seleccionada.

Resultados. La edad promedio de las pacientes fue de 33 años (rango, 17–53 años). El 44,3% de los casos correspondió a NIC III, un 20% a NIC II y el 31,4% a NIC I. Además, se incluyeron 2 casos (2,8%) de carcinoma microinfiltrante y 1 caso (1,4%) de carcinoma condilomatoso. La infección por VPH se presentó en el 94,3% de los casos. El 50% (n=11) de las NIC I resultaron negativas frente a p16. En cambio, los casos de NIC II, NIC III y los carcinomas mostraron una inmunoexpresión progresiva de acuerdo con el grado de agresividad de la lesión (78,6%, 93,3% y 100%, respectivamente) frente a esta proteína. El inmunomarcaje en los casos de NIC III y carcinomas se observó en más de los 2/3 del espesor epitelial. El porcentaje de expresión de Ki67 aumentó progresivamente al avanzar el grado de la lesión. En cuanto a la proteína p53, la mayoría de los casos estudiados (65,7%) (n=46) resultaron negativos. Se observó inmunorreactividad en el 42,8% de los casos de NIC II y en el 35,5% de los casos de NIC III-Carcinoma *in situ*. En ambos tipos de lesiones, la expresión se limitó al 1/3 inferior del espesor epitelial. La media de expresión de survivina en el conjunto de las lesiones estudiadas fue del 14%, con un valor máximo del 41% y afectó a un mayor porcentaje del espesor epitelial a medida que aumentó el grado de lesión intraepitelial, de modo que en el caso de las NIC III-Carcinomas *in situ* y los carcinomas condilomatoso-microinvasores se observó tinción en la totalidad del espesor epitelial en el 58,1% y 66,7% de las muestras, respectivamente. Aurora A se expresó en un 54,3% de los casos con intensidad débil en el 55,7%, moderada en el 17,1% y fuerte en el 27,1% de las lesiones. Se observó expresión de Aurora A en el 1/3 inferior del epitelio en los casos de NIC I (90,9%); en las NIC II predominó el inmunomarcaje en los 2/3 del espesor epitelial mientras que en las NIC III la expresión de Aurora A se observó tanto en los 2/3 como en la totalidad el espesor del epitelio aunque con ligero predominio en los 2/3 (45,2% y 35,5%, respectivamente). Los casos de carcinoma mostraron compromiso de la totalidad del espesor epitelial. En relación a Aurora B, se observó que en la mitad de los casos (50%) el porcentaje de células con inmunomarcaje de la proteína fue del 12%, con un valor máximo del 39%. En los casos de NIC I y NIC II, el patrón de expresión se mantuvo en el 1/3 inferior del epitelio; en cambio, en las NIC III se observó entre los 2/3 y todo el espesor epitelial, en una proporción similar. El caso de carcinoma condilomatoso mostró compromiso de los 2/3 del espesor epitelial y los dos carcinomas microinfiltrantes presentaron un patrón dual, entre los 2/3 y la totalidad del espesor del epitelio.

Conclusiones. La expresión de p16, Ki67 y survivina resultó proporcional al grado de la neoplasia intraepitelial. La tinción con Aurora A fue predominantemente débil pero también mostró un patrón progresivo con el grado de la neoplasia. La inmunorreactividad frente a Aurora B predominó entre el 1/3 inferior y los 2/3 del espesor epitelial, con menor relación con el grado histológico. La inmunoexpresión de p53 fue predominantemente negativa en las muestras de NIC de diversos grados. Se encontró una correlación significativa entre la mayoría de los marcadores utilizados, sobre todo cuando la expresión de estas proteínas fue superior al 1/3 inferior del epitelio. No se observó correlación con p53 debido a su comportamiento variable, predominando la no expresión o la expresión en un porcentaje bajo de células.

Palabras clave. Cáncer de cérvix uterino, neoplasia intraepitelial cervical, VPH, p16, Ki67, p53, survivina, Aurora quinasas A y B.